



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Tania Souza de Liz

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNAs COMO BIOMARCADORES PARA
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL DE CÉLULAS B – LLA-B**

Florianópolis

2020

Tania Souza de Liz

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNAs COMO BIOMARCADORES PARA
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL DE CÉLULAS B – LLA-B**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, para
obtenção do título de Doutor em Farmácia.
Orientadora: Prof^a Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, Dra.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Liz, Tania Souza de Liz
Avaliação da expressão de microRNAs como biomarcadores
para leucemia linfoblástica aguda infantil de células B -
LLA-B / Tania Souza de Liz Liz ; orientador, Tânia Beatriz
Creczynski-Pasa Creczynski-Pasa, 2020.
74 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. microRNA. 3. LLA-B. 4. biomarcador. I.
Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. III. Título.

Tania Souza de Liz

**“Avaliação da expressão de microRNAs como biomarcadores para leucemia
linfoblástica aguda infantil de células B – LLA-B”**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof. (a) Thaís Cristine Marques Sincero, Dra.

(UFSC – Membro Titular)

Prof. (a) Iara Fabricia Kretzer, Dra.

(UFSC – Membro Titular)

Prof. (a) Sheila Maria Brochado Winnischofer, Dra.

(UFPR – Membro Externo)

Prof. (a) Maria Luiza Bazzo, Dra.

(UFSC - Membro Suplente)

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Prof.(a) Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2020

Esta tese é dedicada ao primeiro idealizador deste trabalho: meu pai.

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida,

Aos meus pais, familiares e amigos, pelo carinho e apoio incondicional,

Aos colegas do Laboratório Neurogene e Geimm e Ciência pelo apoio essencial,

Ao marido e enteada pela compreensão e apoio,

Aos pacientes, médicas e auxiliares pela doação,

A professora e orientadora pelos ensinamentos e direcionamentos,

Aos todos que colaboraram de alguma forma na execução deste trabalho.

*“Sábio não é o que nunca erra, mas o que usa seus
erros para crescer (CURY, 2001)”*

RESUMO

A Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) é uma doença maligna que afeta a linhagem progenitora linfóide do tecido hematopoiético. É considerada a neoplasia mais comum em crianças e adolescentes e apresenta alta incidência em crianças entre 2 e 5 anos de idade. O diagnóstico é estabelecido por meio de exames citoquímicos, de imunofenotipagem, de citogenética e através da investigação de mutações específicas em amostras de medula óssea e sangue periférico. Entretanto, a dificuldade em obter amostra suficiente de medula óssea de alguns pacientes para a realização de todos os testes diagnósticos e a frequente dificuldade em classificar os subtipos de leucemias menos comuns, são fatores que desafiam o estabelecimento de um diagnóstico completo. Neste sentido, a busca por novos marcadores no sangue periférico poderia complementar o diagnóstico das leucemias. Pequenas moléculas de RNA, chamadas de microRNAs (miRNAs) vêm sendo investigadas como possíveis marcadores para várias doenças, inclusive o câncer. Nas leucemias já foram descritos diversos miRNAs, cujos perfis de expressão apresentam-se alterados quando comparados a amostras de pacientes sem a doença. O objetivo principal deste trabalho é comparar os perfis de expressão de miRNAs entre amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes com LLA-B. Ao utilizar a técnica de microarranjo, não foi encontrada diferença significativa nos perfis de expressão entre os dois tipos de amostras. Pela técnica de PCR quantitativo não houve diferença significativa em doze dos quatorze miRNAs avaliados (miR-195-5p, miR-363-3p, miR-410-3p, miR-4701-5p, miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p, miR-125b-5p e miR-223-3p). Quando comparadas amostras de sangue periférico de pacientes com LLA-B com amostras de indivíduos sem a doença, pela técnica do Microarranjo, foi observado que os miRNAs: miR-195-5p; miR-363-3p e miR-4701-5p apresentaram-se *Upregulated* enquanto os miRNAs miR-127-3p; miR-152-3p; miR-337-5p; miR-381-3p; miR-409-3p; miR-410-3p; miR-4485-3p; miR-495-3p; miR-584-5p e miR-8063 apresentaram-se *Downregulated*. Pela técnica da RT-qPCR, apenas o miR-410-3p apresentou-se *Downregulated*. Os miRNAs miR-195-5p; miR-363-3p, miR-4701-5p, miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p e miR-223-3p apresentaram-se superexpressos. A análise de vias enriquecidas revelou genes com papel regulatório importante em vias metabólicas relacionadas a diferenciação, proliferação celular e apoptose. Estes dados, além de sugerir a equivalência entre os perfis de expressão de miRNAs nas amostras de sangue periférico e da medula óssea avaliadas, sugerem também que alguns miRNAs têm potencial para servirem como biomarcadores para a LLA-B.

Palavras-chave: Leucemia linfoblástica aguda de células B. microRNA. Biomarcador. Medula óssea. Sangue periférico.

ABSTRACT

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is a malignant disease affecting lymphoid progenitor cells. It is the most common neoplasm in children and adolescents, with a particularly high incidence in children aged 2 to 5 years. Diagnosis is made by cytochemical tests, immunophenotyping, cytogenetics, and investigation of specific mutations in bone marrow and peripheral blood samples. Some factors, however, hinder the establishment of a definitive diagnosis, including difficulty in obtaining an adequate bone marrow specimen for diagnostic tests and difficulty in identifying rare leukemia subtypes. Peripheral blood markers may serve as complementary tools for leukemia diagnosis. Small RNA molecules known as microRNAs (miRNAs) have been investigated as possible markers for various diseases, including cancer. Several miRNAs were found to be differentially expressed in leukemic patients compared to healthy subjects. The main objective of this study was to compare miRNA expression profiles between bone marrow and peripheral blood samples of patients with B-ALL. When using the microarray technique, we observed no significant difference in miRNA expression profiles between peripheral blood and bone marrow samples from patients with B-ALL. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis did not reveal significant differences between bone marrow and peripheral samples for 12 of the 14 miRNAs tested (miR-195-5p, miR-363-3p, miR-410-3p, miR-4701-5p, miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p, miR-125b-5p, and miR-223-3p). Comparison of samples from healthy subjects and B-ALL patients by the microarray technique showed that miR-195-5p, miR-363-3p, and miR-4701-5p were upregulated, whereas miR-127-3p, miR-152-3p, miR-337-5p, miR-381-3p, miR-409-3p, miR-410-3p, miR-4485-3p, miR-495-3p, miR-584-5p, and miR-8063 were downregulated. By qPCR, only miR-410-3p was found to be downregulated. miR-195-5p, miR-363-3p, miR-4701-5p, miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p, and miR-223-3p were highly expressed. Analysis of enriched pathways revealed genes with important regulatory roles in metabolic routes associated with cell differentiation, proliferation, and apoptosis. These data not only suggest an equivalence between blood and bone marrow miRNA expression profiles but also indicate that some miRNAs have the potential to serve as biomarkers for B-ALL.

Keywords: B-cell acute lymphoblastic leukemia. microRNA. biomarker. bone marrow. peripheral blood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma das atividades realizadas.	16
Figura 2 - Número de casos de câncer incidentes no Brasil em 2018.	17
Figura 3 - Biogênese dos miRNAs.	22
Figura 4 - Diferenciação de células tronco hematopoiéticas.	23
Figura 5 - Dados relacionados ao subtipo de LLA-B e sexo dos pacientes.	34
Figura 6 – Integridade do RNA total em amostras de medula óssea e sangue periférico.	38
Figura 7 – Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos em amostras de sangue periférico de pacientes comparados aos dados dos indivíduos controle.	40
Figura 8 - Expressão dos miRNAs em amostras de sangue periférico, comparando pacientes com indivíduos controle.	42
Figura 9 – Diagrama de Venn do número de genes envolvidos e os miRNAs presentes nas 4 vias KEGG destacadas.	44
Figura 10 – Diagramas de Venn dos genes em comum entre as combinações de três vias enriquecidas.	46
Figura 11 – Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos em amostras do paciente com trissomia 8 comparado aos indivíduos controle.	47
Figura 12 – Perfil de expressão dos miRNAs em amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes com LLA-B.	49
Figura 13 – Expressão relativa dos miRNAs em amostras de sangue periférico comparando amostras de pacientes com amostras controle.	51
Figura 14 - Via de transcrição desregulada no câncer associada a LLA-B precursora.	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Perfil imunofenotípico da LLA-B.....	20
Quadro 2 - Classificação das Leucemias/Linfomas linfoblásticos de células B segundo a OMS.	21
Quadro 3 - Seleção dos miRNAs e suas respectivas sequências de iniciadores.....	30
Quadro 4 – Reagentes para a etapa de poliadenilação e seus respectivos volumes.	31
Quadro 5 – Reagentes utilizados para a síntese de cDNA e seus respectivos volumes. ...	31
Quadro 6 - Reagentes utilizados na reação da RT-qPCR.....	32
Quadro 7 - Dados relacionados ao subtipo de LLA-B e sexo dos pacientes.....	35
Quadro 8 - Alterações genéticas encontradas nos pacientes.	37
Quadro 9 - Amostras utilizadas nas lâminas de Microarranjo.....	39
Quadro 10 – Genes e miRNAs envolvidos nas vias metabólicas destacadas.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de blastos encontrados nos pacientes, segundo o tipo de exame.....	36
Tabela 2 - miRNAs diferencialmente expressos nas amostras de sangue periférico entre pacientes e indivíduos controle.....	41
Tabela 3 – Vias KEGG enriquecidas.....	44
Tabela 4 – Eficiências das reações de RT-qPCR dos miRNAs alvos.	48
Tabela 5 – Valores de P comparando perfis de expressão de miRNAs entre amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes com LLA-B.....	50
Tabela 6 - Perfis de expressão dos miRNAs.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CALLA	do inglês <i>common acute lymphoblastic leukemia antigen</i>
CD	do inglês <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
EDTA	do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FC	do inglês <i>fold change</i>
FISH	do inglês <i>fluorescence in situ hybridization</i>
GCO	do inglês <i>Global Cancer Observatory</i>
IgM	Imunoglobulina M
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de célula B
miRNA	MicroRNA
MPAL	Leucemia aguda de fenótipo misto
mRNA	RNA mensageiro
NIH	do inglês <i>National Institute of Health</i>
nt	Nucleotídeos
PBS	do inglês <i>phosphate buffer saline</i>
qPCR	do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RHC	Registro hospitalar de câncer
RIN	do inglês <i>RNA integrity number</i>
RISC	do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
rRNA	RNA ribossomal
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1.2	Incidência e estimativas	17
1.1.3	Leucemia linfoblástica aguda de células B	18
1.1.4	Classificação das leucemias	19
1.1.5	microRNAs	21
1.1.6	miRNAs em LLA	22
1.2	OBJETIVOS	25
1.2.1	Objetivo geral	25
1.2.2	Objetivos específicos	25
2	MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1	AMOSTRAS DOS PACIENTES	26
2.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO	26
2.3	COLETA DE DADOS	27
2.3.1	Acesso ao Prontuário	27
2.3.2	Comitê de Ética	27
2.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	27
2.4.1	Separação das Células Mononucleares	27
2.4.2	Extração de RNA	28
2.4.2.1	<i>Quantificação do RNA Total</i>	28
2.4.2.2	<i>Integridade do RNA</i>	28
2.4.3	Microarranjo	29
2.4.4	PCR Quantitativo	30
2.4.5	Análise dos dados e testes estatísticos	32
2.4.6	Análise de Enriquecimento	33
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1	PACIENTES	34
3.2	LEVANTAMENTO DOS DADOS COMPLEMENTARES	35
3.3	QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO RNA	38
3.4	MICROARRANJO	39
3.5	ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO	44
3.6	PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAs NA TRISSOMIA DO 8:	47
3.7	PCR QUANTITATIVO	48
3.7.1	Vias Metabólicas:	55

4 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	68
APÊNDICE B	69
APÊNDICE C	70
ANEXO A	71

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), também conhecida como Leucemia Linfocítica Aguda ou Leucemia Linfóide Aguda, consiste em uma doença maligna caracterizada pela proliferação clonal alterada de células progenitoras linfóides e acúmulo destas células imaturas na medula óssea e em outros órgãos (CABRAL et al., 2012; ZANETTE et al., 2007). A incidência da LLA é maior entre crianças com menos de 6 anos (75%), especialmente as de 2 a 5 anos de idade de cor branca e do sexo masculino (FARIAS; CASTRO, 2004; SWERDLOW et al., 2017). Entre as LLAs, a Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) consiste no câncer mais frequente na infância (SANJUAN-PLA et al., 2015). A etiologia da LLA-B ainda é desconhecida, entretanto alguns fatores genéticos como a Síndrome de Down (ZIINO et al., 2006) ou ainda mutações do tipo polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) em genes como *GATA3*, *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE* e *CDKN2A/B* são associadas a um risco aumentado de desenvolvimento desta doença (PEREZ-ANDREU et al., 2013; SWERDLOW et al., 2017).

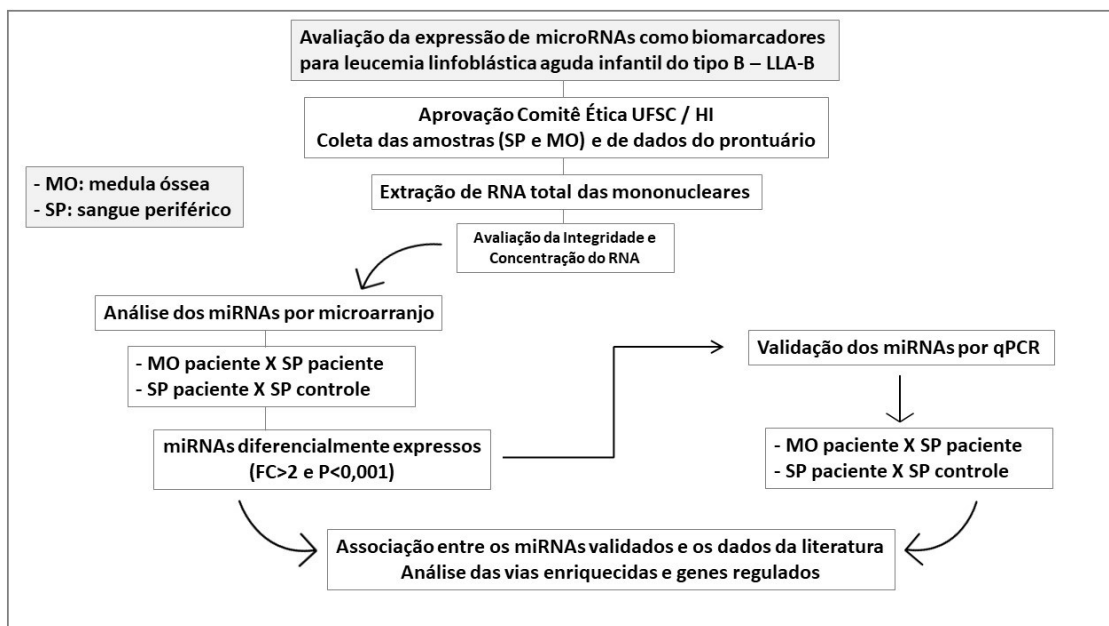
A abordagem diagnóstica de neoplasias hematológicas, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), leva em conta critérios como morfologia celular, imunofenótipo, alterações genéticas e características clínicas. Novas tecnologias como o sequenciamento de nova geração e a avaliação de perfis de expressão gênica têm revelado novos mecanismos de tumorigênese e potenciais alvos terapêuticos, além de trazer contribuições importantes para o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico (SWERDLOW et al., 2017). Segundo a OMS, qualquer classificação de doenças deve ser periodicamente revisada e atualizada (SWERDLOW et al., 2017). Neste contexto, a busca por novos biomarcadores, aliada aos demais critérios de diagnóstico adotados pela OMS, pode facilitar a classificação das neoplasias, direcionar o tratamento e aumentar a sobrevida dos pacientes.

Diversos estudos vêm destacando a influência de pequenas moléculas de RNA não codificantes no surgimento e progressão de doenças, inclusive das leucemias. Os microRNAs (miRNAs) particularmente, apresentam importante papel regulador em processos biológicos como diferenciação e proliferação celular e apoptose, os quais são eventos chave no surgimento do câncer (RASHED et al., 2019). Estima-se que mais de 60% dos genes codificantes em humanos são regulados por miRNAs e que esta regulação em nível pós-transcricional pode resultar no silenciamento de genes alvo através da clivagem de RNA mensageiros (mRNAs) ou pela inibição da síntese de proteína (FRIEDMAN et al., 2009). Alguns miRNAs, com perfis de expressão alterados quando comparados a amostras normais, são associados a subtipos

específicos de leucemia e, portanto, podem ser importantes biomarcadores no diagnóstico e classificação desta doença (JU et al., 2009a; LUAN; YANG; CHEN, 2015).

Este trabalho é o primeiro a avaliar os perfis de expressão de miRNAs em pacientes com diagnóstico de LLA-B provenientes do estado de Santa Catarina. Neste estudo foram utilizadas técnicas de microarranjo e de PCR quantitativo para comparar os perfis de expressão de miRNAs entre amostras de medula óssea e sangue periférico. A equivalência entre os perfis dos dois tipos de amostras permitiria a investigação de miRNAs importantes utilizando apenas amostras de sangue periférico. Além de apresentar um custo reduzido quando comparado à punção da medula óssea, a coleta de sangue periférico também representa menor risco e desgaste aos pacientes. Os miRNAs como marcadores presentes no sangue periférico podem tornar-se ferramentas importantes tanto para o diagnóstico quanto para o acompanhamento da evolução da doença. A Figura 1 mostra o resumo das atividades realizadas neste trabalho.

Figura 1 – Organograma das atividades realizadas.



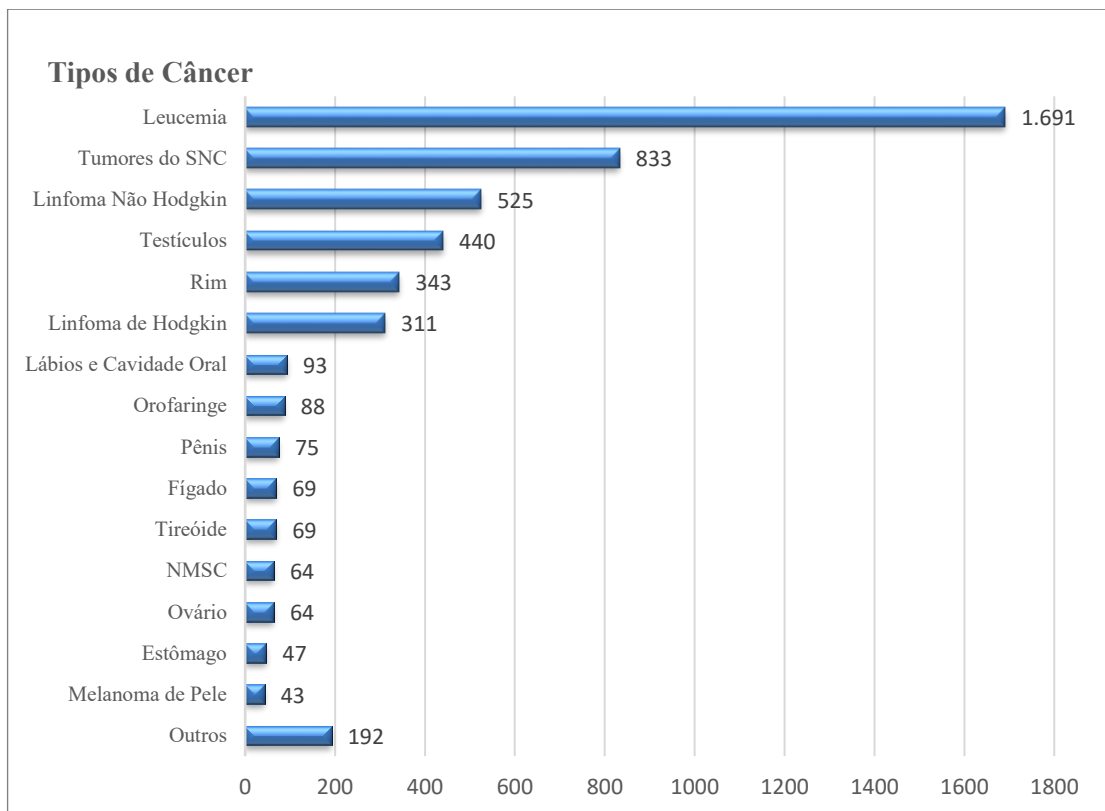
Fonte: Elaborado pelo autor.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.2 Incidência e estimativas

A leucemia é o tipo de câncer mais comum em crianças e adolescentes, representando em média 30% dos diagnósticos (STILLER, 2009). Em seguida, encontram-se os tumores do sistema nervoso central (SNC), linfomas e tumores sólidos, como o neuroblastoma e o tumor de Wilms (GUPTA et al., 2015; STELIAROVA-FOUCHER et al., 2017). Segundo dados do Observatório Global do Câncer (GCO), no Brasil, a incidência estimada de casos de leucemia na população infantil (0-14 anos) em ambos os sexos foi de 1.691 casos para o ano de 2018 (Figura 2), seguido pelos tumores do SNC, pelo linfoma não Hodgkin e demais tipos de câncer (FERLAY et al., 2018).

Figura 2 - Número de casos de câncer incidentes no Brasil em 2018.



Fonte: Adaptado de Observatório Global do Câncer (2018).

Nota: Considerando ambos os sexos e idade de 0 a 14 anos. NMSC: Câncer de pele não melanoma, SNC: Sistema nervoso central.

Entre as leucemias infanto-juvenis, a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é a mais frequente (TOMIZAWA, 2015). A incidência mundial da LLA estimada em todo o mundo é de 1 a 4,75 casos por 100.000 habitantes por ano e 75% das LLAs ocorrem em crianças com idade menor de 6 anos (SWERDLOW et al., 2016). Alguns estudos relatam que a variação geográfica influencia nas taxas de incidência da leucemia infantil através de diversas causas como fatores sócio-econômicos, diferença de etnias entre outras variantes (REIS et al., 2016). No Brasil, a maioria destes dados vêm de informações contidas em registros de base populacional chamados de Registro Hospitalar de Câncer (RHC). No período de 1999–2010 a taxa de incidência média de LLA ajustada por idade foi de 6,1 por 100.000 crianças menores de 5 anos e uma taxa de incidência média de LLA ajustada por idade de 4,4 por 100.000 crianças acima de 5 anos de idade (REIS et al., 2016). Segundo dados do INCA, a região Sul apresenta uma estimativa de 1.310 novos casos de câncer infanto-juvenil por 1 milhão de crianças e adolescentes (0-19 anos) para 2020, sendo 330 casos apenas no estado Santa Catarina (INCA, 2020). Segundo dados do RHC do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), o qual inclui o registro dos novos casos de neoplasias malignas primárias em crianças e adolescentes com até 15 anos incompletos procedentes do estado de Santa Catarina, no período de 2014-2018, a leucemia foi a neoplasia maligna primária mais frequente em crianças e adolescentes (32,38% n=125), seguida pelos tumores do sistema nervoso central e miscelânea de neoplasias intracranianas e intra-espinhais (13,73%) e pelos linfomas e neoplasias retículo-endoteliais (10,36%). Considerando o grupo de diagnóstico das leucemias, a LLA foi a mais comum (76% n=95) (SILVA; SILVA, 2019). Ao analisar a taxa de sobrevida, calculada com base nas informações de incidência e mortalidade, verificou-se neste mesmo período que 86,4% das crianças/adolescentes diagnosticadas com leucemia estão vivas e 13,6% foram a óbito. No Brasil, a taxa de sobrevida dos pacientes pediátricos com câncer vem melhorando nas últimas décadas e hoje encontra-se em torno de 80%, considerando diagnóstico precoce e tratamento adequado (SILVA; SILVA, 2019).

1.1.3 Leucemia linfoblástica aguda de células B

A Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) consiste em uma neoplasia de células precursoras linfoides da linhagem B, que envolve tanto a medula óssea quanto o sangue periférico. Caracteriza-se pela presença de blastos de pequeno a médio tamanho com citoplasma escasso, cromatina moderadamente condensada e nucléolo pouco evidente. Ocasionalmente, pode apresentar envolvimento de sítios nodais ou extranodais (SWERDLOW et al., 2017). Muitos protocolos de tratamento consideram leucemia, quando o valor de blastos na medula

óssea encontra-se acima de 25%, o que acontece na maioria dos casos. Ao contrário das leucemias mieloides, não há um limite mínimo definido na porcentagem de blastos necessário para estabelecer um diagnóstico de LLA. (SWERDLOW et al., 2017). A maioria dos pacientes com LLA-B apresenta trombocitopenia, anemia e / ou neutropenia. Outros sintomas incluem linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, dor óssea e dores nas articulações (SWERDLOW et al., 2017).

1.1.4 Classificação das leucemias

Segundo a última revisão do sistema de classificação de tumores dos tecidos hematopoiético e linfoide da OMS, a combinação de características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e genéticas continua a ser usada na identificação e classificação das doenças hematológicas, além de estabelecer diretrizes para o diagnóstico de diversas neoplasias (ARBER et al., 2016; SWERDLOW et al., 2017). A avaliação da morfologia celular é feita tanto através de microscopia ótica, utilizando esfregaços de medula óssea obtida por punção aspirativa quanto através do hemograma, que engloba um conjunto de avaliações dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas do sangue periférico (ROSENFELD, 2012). A imunofenotipagem por citometria de fluxo identifica antígenos de superfície, intracitoplasmáticos e nucleares chamados de CD (grupo de diferenciação, do inglês: *cluster of differentiation*), através do uso de anticorpos monoclonais específicos, possibilitando caracterizar as células da medula óssea e do sangue periférico quanto à origem (linhagem B ou T) e grau de diferenciação (SILVEIRA; ARRAES, 2008). Os linfoblastos da linhagem B são geralmente positivos para os marcadores CD19, cCD79a e cCD22. Embora nenhum deles seja específico *per se*, a positividade em combinação ou a expressão destes marcadores em alta intensidade direciona o diagnóstico da LLA-B. Os marcadores CD10, CD22 de superfície, CD24, PAX5 e TdT são positivos na maioria dos casos, enquanto a expressão de CD20 e CD34 é variável. O CD45 quando presente, é geralmente expresso de forma mais fraca do que nas células B maduras (SWERDLOW et al., 2017).

Os subtipos de LLA-B são descritos com base no padrão de expressão de antígenos celulares, os quais são determinados pela etapa de diferenciação celular. Neste caso, as leucemias foram divididas de acordo com os estágios de diferenciação das células progenitoras na medula óssea e foram classificadas em: pró-B, comum, pré-B e B-madura (FARIAS; CASTRO, 2004). O Quadro 1 apresenta os antígenos característicos de cada subtipo de leucemia linfoide de linhagem B.

Quadro 1 - Perfil imunofenotípico da LLA-B.

Marcador	Pró-B	Comum	Pré-B	B madura
HLA-DR	+	+	+	+
TdT	+	+	+	+/-
CD19	+	+	+	+
CD22(c)	-/+	+	+	+
CD10	-	+	+	-/+
CD20	-	-/+	+	+
c μ	-	-	+	-
SmIg	-	-	-	+
CD7	-	-	-	-
CD2	-	-	-	-
CD3(c)	-	-	-	-
CD1a	-	-	-	-
CD3	-	-	-	-
CD4/CD8	-	-	-	-

Fonte: Adaptado de FARIAS; CASTRO (2004).

Nota: TdT: Terminal desoxinucleotidil transferase; CD22(c): CD22 intracitoplasmático, c μ : cadeia μ citoplasmática; SmIg: imunoglobulina de superfície; +: expressão do antígeno; +/-: expressão variável, frequentemente positiva; -: ausência da expressão do antígeno; -/+ : expressão variável, frequentemente negativa.

De acordo com a classificação da OMS, a LLA-B é dividida em dois subtipos: LLA-B não especificada e LLA-B com anormalidades genéticas recorrentes (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**Quadro 2). Conforme a presença de anormalidades cromossômicas recorrentes e específicas, a LLA-B é subdividida em nove grupos. São eles: LLA-B com t(9;22)(q34;q11.2) apresentando a fusão entre os genes *BCR-ABL-1*; LLA-B com t(v;11q23) com rearranjos no gene *MLL*; LLA-B com t(12;21)(p13;q22) apresentando a fusão entre os genes *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*; LLA-B com hiperdiploidia; LLA-B com hipodiploidia; LLA-B com t(5;14)(q31;q32) apresentando a fusão entre os genes *IL3-IGH*; LLA-B com t(1;19)(q23;p13.3) com a fusão dos genes *TCF3-PBX1*; LLA-B com *BCR-ABL-like*, envolvendo outros genes com função tirosina cinase e LLA-B com amplificação de regiões do cromossomo 21 (iAMP21). Na ausência destas anormalidades, a leucemia é considerada como “não especificada” (SWERDLOW et al., 2017). Quando não é possível a detecção de alterações, devido ao nível de resolução da técnica de citogenética convencional, testes genéticos adicionais podem ser realizados, como por exemplo a detecção do rearranjo *ETV6-RUNX1* pela técnica da PCR.

Quadro 2 - Classificação das Leucemias/Linfomas linfoblásticos de células B segundo a OMS.

- 1- Leucemia/Linfoma linfoblástico B, NOS (não especificada)
- 2- Leucemia/Linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
 - 2.1- Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1
 - 2.2- Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(v;11q23.3); rearranjo KMT2A
 - 2.3- Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
 - 2.4- Leucemia/Linfoma linfoblástico B com hiperploidia
 - 2.5- Leucemia/Linfoma linfoblástico B com hipoploidia
 - 2.6- Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH
 - 2.7- Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;13.3);TCF3-PBX1
 - 2.8- Classe provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico B, BCR-ABL1-like
 - 2.9- Classe provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico B, com iAMP21

Fonte: Adaptado de ARBER et al. (2016).

Nota: NOS: do inglês Not Otherwise Specified

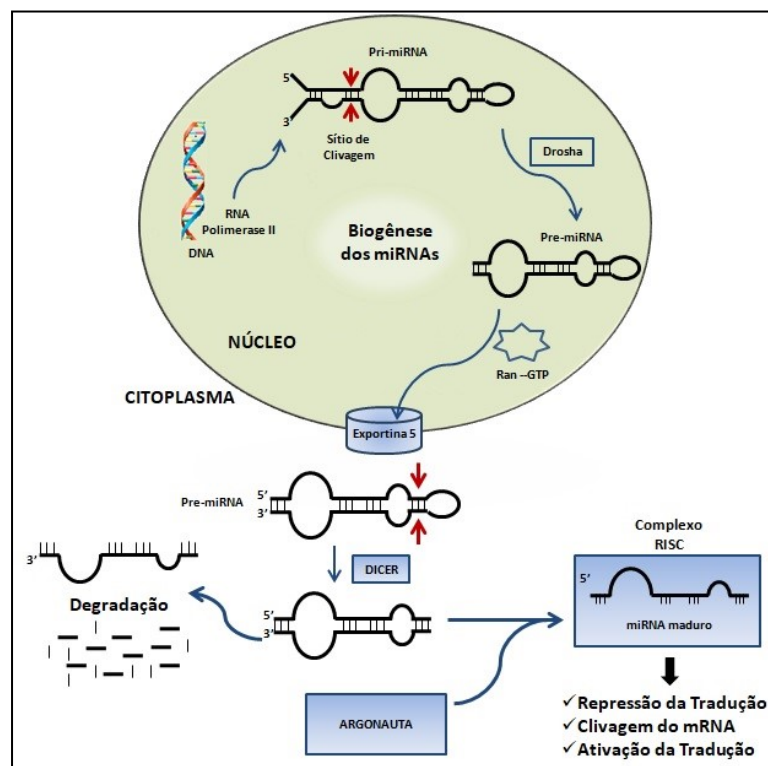
1.1.5 microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA endógenas (~22 nucleotídeos) não-codificantes (LUNA-AGUIRRE et al., 2015) que degradam e/ou reprimem a tradução direta de RNAs mensageiros (mRNAs) através do pareamento de bases principalmente com a região 3' não traduzida dos mRNAs (3'-UTR), impedindo a expressão de proteínas (MATTICK; MAKUNIN, 2006). Os miRNAs são transcritos derivados de íntrons e de éxons tanto de regiões codificadoras quanto de regiões não codificadoras de proteínas e são sintetizadas pela RNA Polimerase II (CAMMAERTS et al., 2015).

A biogênese dos miRNAs é iniciada no núcleo, com a formação de uma molécula de miRNA primário (Pri-miRNA) com 70-110 nucleotídeos (nt), formada a partir da atuação da RNA-Polimerase II sobre genes específicos. A endonuclease Droscha (uma RNase tipo III) processa e transforma este pri-miRNA em um miRNA precursor (pré-miRNA), com aproximadamente 70 nt em forma de grampo (*hairpin*), o qual será transportado para o citoplasma pela enzima Exportina-5. No citoplasma, a RNase III chamada Dicer retira a região não pareada em forma de alça do Pré-miRNA para formar uma dupla-fita com 22 pares de nt. Uma helicase separa o pré-miRNA em duas fitas simples. Uma das fitas será degradada e a outra será associada ao complexo enzimático RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), estando prontos para atuar sobre mRNAs específicos (

Figura 3) (CAMMAERTS et al., 2015; IORIO; CROCE, 2012). Uma vez incorporado ao complexo RISC, o miRNA maduro pode atuar de três maneiras diferentes. A primeira baseia-se na inibição da tradução do mRNA com a participação de proteínas do tipo Argonata, através do pareamento imperfeito de bases entre o miRNA e a região 3' não traduzida do mRNA alvo. A segunda envolve a clivagem do mRNA, através do pareamento perfeito entre o miRNA e a região 3' não traduzida do mRNA. E o terceiro mecanismo regulatório baseia-se na ativação da tradução e envolve a interação do miRNA com a região 5' não traduzida do mRNA (DO AMARAL et al., 2018; VASUDEVAN; TONG; STEITZ, 2007).

Figura 3 - Biogênese dos miRNAs.



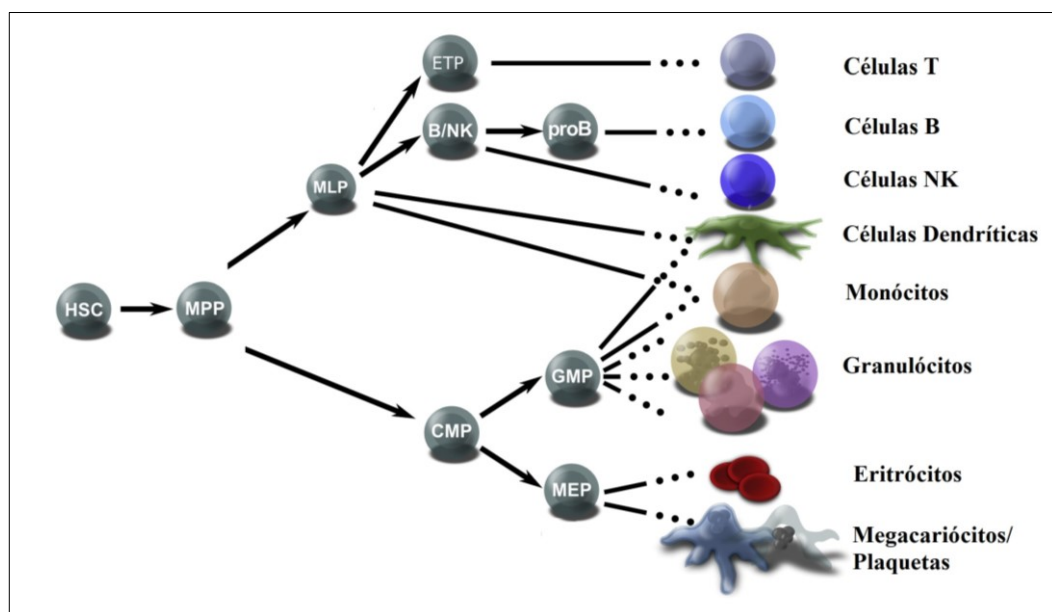
Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em DO AMARAL e colaboradores (2018).

1.1.6 miRNAs em LLA

O processo hematopoiético depende de uma série de mecanismos moleculares altamente orquestrados, os quais levam uma célula tronco multipotente hematopoiética a autorrenovar-se e diferenciar-se em linhagens celulares circulantes. A linfopoiese é uma parte da hematopoiese que trata da diferenciação das células tronco multipotentes em progenitores linfoides e estes em linfócitos B e T (Figura 4) (LUAN; YANG; CHEN, 2015). O tecido hematopoiético divide-se basicamente em dois grandes grupos celulares: a linhagem linfóide e

a medula óssea. A linhagem linfóide é composta por células T, B e NK, responsáveis pela resposta imune adaptativa e inata. A linhagem mielóide inclui os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e basófilos), monócitos, eritrócitos e megacariócitos. Em uma escala hierárquica de maturação, a célula tronco hematopoiética ocupa o ápice da cadeia. Na linhagem linfóide, primeiramente ela se diferencia em uma célula progenitora multipotente a qual dá origem posteriormente a um progenitor linfóide. Este por sua vez origina todas as linhagens linfóides, incluindo as células T, B e NK (DOULATOV et al., 2012) (Figura 4).

Figura 4 - Diferenciação de células tronco hematopoiéticas.



Fonte: Imagem adaptada de DOULATOV e colaboradores (2012).

Nota: HSC: Célula tronco hematopoiética; MPP: Progenitor multipotente; MLP: Progenitor linfóide; ETP: Primeiro progenitor tímico; B: célula B; NK: Célula NK; CMP: Progenitor mielóide comum, GMP: Progenitor de monócitos e granulócitos, MEP: Progenitor megacariocítico-eritróide.

A diferenciação da célula progenitora linfóide em células B maduras é regulada por múltiplos fatores de transcrição, incluindo os miRNAs. A expressão dos miRNAs muda a cada estágio do desenvolvimento das células B, e a desregulação de miRNAs específicos interfere no crescimento e maturação destas células (KOTAKI et al., 2017). A LLA que envolve tanto linhagens B como T tem como característica a parada em diferentes estágios na maturação linfóide, culminando na caracterização de diferentes imunofenótipos e diferentes perfis de expressão (assinaturas) de miRNAs. Estes perfis podem ajudar na classificação e diagnóstico das LLAs (LUAN; YANG; CHEN, 2015). De Oliveira e colaboradores (2012) encontraram perfis de expressão aumentados de miRNA-128a e de miRNA-181b em pacientes com LLA, enquanto os miRNA-100, miRNA-196b e let-7e apresentaram níveis de expressão reduzidos

(DE OLIVEIRA et al., 2012). Pacientes com LLA com prognóstico desfavorável e com rearranjos no gene *MLL*, comparados a pacientes com prognóstico favorável, apresentaram diferenças nos perfis de expressão de miRNAs (SCHOTTE et al., 2009a). Zhang e colaboradores (2009) encontraram níveis aumentados dos miRNAs miR-128a, miR-128b, miR-213, miR-210, miR-130b, miR-146a e miR-34a em pacientes com LLA. Foi observado ainda que o perfil de expressão de alguns miRNAs pode ser associado à resposta terapêutica ao tratamento com Prednisona. Os miRNAs: miR-18a, miR-532, miR-218, miR-625, miR-193a, miR-638, miR-550 e miR-633 diferenciaram pacientes infantis com LLA apresentando pobre resposta a Prednisona em relação a um grupo com boa resposta (ZHANG et al., 2009b). Na LLA Pré-B, Ju e colaboradores (2009) observaram o perfil de expressão aumentado de: miR-222, miR-339 e miR-142-3p e um perfil diminuído de miR-451 e miR-373 (JU et al., 2009b). Schotte e colaboradores (2011) analisaram os níveis de expressão de 397 miRNAs e observaram que diferentes subtipos de LLA, em casos com resistência a fármacos, apresentaram perfis de expressão de miRNA únicos (SCHOTTE et al., 2011a). Estas investigações são extremamente importantes no entendimento do papel funcional de miRNAs específicos em diferentes subtipos de LLA infantil.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de expressão de miRNAs em amostras de sangue periférico e medula óssea em pacientes infantis com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B).

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de expressão dos miRNAs em amostras de sangue periférico e medula óssea através da técnica de microarranjo;
- Validar o perfil de expressão dos principais miRNAs alterados através da técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR);
- Comparar os perfis de expressão de miRNAs entre amostras de sangue periférico e de medula óssea dos pacientes com LLA-B;
- Comparar os perfis de expressão de miRNAs obtidos neste estudo com os descritos na literatura;
- Relacionar vias metabólicas importantes aos miRNAs diferencialmente expressos através de análise de bioinformática.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS DOS PACIENTES

As amostras de sangue periférico e medula óssea foram coletadas de pacientes com idade até 14 anos com diagnóstico de LLA-B atendidos pelo Serviço de Onco-hematologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), Florianópolis, SC, Brasil, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos pais e/ou responsáveis. As amostras foram provenientes de coletas feitas para a realização de outros exames de diagnóstico. Nenhuma coleta foi realizada especificamente para este estudo. Aproximadamente 2 mL da medula óssea e 3 mL de sangue periférico foram colocados em tubos com EDTA e mantidas refrigeradas até a sua preparação. As amostras controle (n=09), constituídas por sangue periférico, foram coletadas de crianças sem suspeita ou indicação de doença hematológica, recrutadas durante a realização de outros exames, por demanda espontânea no laboratório de apoio do HIJG. Após assinatura do TCLE pelos pais e/ou responsáveis, profissionais habilitados desta mesma instituição separaram aproximadamente 3 mL de sangue periférico coletados em tubos com EDTA, os quais foram posteriormente manipulados. O TCLE encontra-se no ANEXO 1.

2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

Como critério de inclusão, foram utilizadas amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) coletadas de pacientes com idade de até 14 anos com diagnóstico de LLA-B, provenientes do HIJG. Como critério de exclusão, não foram processadas amostras de pacientes com qualquer outro diagnóstico diferente de LLA-B, amostras hemolisadas, amostras de medula óssea infiltradas com sangue periférico e amostras de pacientes em que não seja possível acessar o prontuário médico ou ainda de pacientes em tratamento.

2.3 COLETA DE DADOS

2.3.1 Acesso ao Prontuário

Foram utilizados dados dos prontuários dos pacientes, tais como idade, sexo, resultados de exames de imunofenotipagem, mielograma, hemograma, citogenética e de PCR qualitativo, os quais são exames de diagnóstico realizados em paralelo por outros laboratórios como rotina. O acesso ao prontuário foi permitido pelos pais e/ou responsáveis através da assinatura do TCLE.

2.3.2 Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFSC (CAAE: 57311416.1.0000.0121, Parecer: 2042515) e pelo comitê de ética do Hospital Infantil Joana de Gusmão (Parecer 003/2017). Conforme a Resolução 466/12 do CNS foi solicitado aos pais e/ou responsáveis pelos participantes da pesquisa o uso das amostras, bem como de resultados de exames complementares através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). As amostras biológicas dos pacientes foram fornecidas por meio da colaboração com as hematologistas e profissionais da saúde do laboratório de apoio do hospital. Todos os dados coletados dos pacientes foram e continuarão mantidos em sigilo e anonimato.

2.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

2.4.1 Separação das Células Mononucleares

As células mononucleares das amostras de sangue periférico e de medula óssea, utilizadas neste estudo, foram separadas por gradiente de densidade, utilizando Histopaque[®] 1077 (Densidade: 1.077 g/mL) (Sigma-Aldrich, Darmstat, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Primeiramente as amostras foram diluídas em solução salina tamponada (PBS) na proporção 1:1 e delicadamente depositadas em tubo de ensaio contendo 3 mL de Histopaque[®]. Em seguida, o tubo foi centrifugado a $400 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi possível isolar a fração mononuclear presente no halo formado entre o plasma e o Histopaque[®]. A fração mononuclear obtida foi diluída em PBS e novamente centrifugada a

300 × g por 8 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, as células mononucleares foram suspendidas em PBS e avaliadas quanto a viabilidade celular por exclusão com o corante azul de tripan. Subsequentemente, 1×10^7 células foram ressuspendidas em solução de RNAlater[®] 20 × (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA) para estabilização do RNA e posteriormente transferidas para microtubos os quais foram armazenados a -80°C.

2.4.2 Extração de RNA

O RNA total das células mononucleares, obtidas do sangue periférico e da medula óssea, foi extraído e purificado utilizando-se *mirVana*[™] miRNA Isolation Kit (Ambion Life Technologies, Austin, TX, USA) conforme as instruções do fabricante. O primeiro passo do procedimento para extração do RNA foi a lise das células utilizando-se um tampão de lise desnaturante. Em seguida, foi realizada a extração com fenol-clorofórmio separando a amostra em duas fases, das quais apenas a fase aquosa superior, contendo o RNA, foi utilizada. Após a adição de etanol à amostra, esta solução foi passada pelo filtro contendo fibra de vidro, no qual o RNA total ficou retido. O filtro foi então lavado e o RNA recuperado através da etapa de eluição com água livre de RNase. As amostras de RNA foram armazenadas à -80 °C.

2.4.2.1 Quantificação do RNA Total

A quantificação do RNA total foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus[®] (GE Healthcare Life Sciences, UK). O pico de absorbância do RNA ocorre no comprimento de onda de 260 nm e cada unidade de densidade óptica nesta absorbância equivale a 40 µg/mL de RNA total.

2.4.2.2 Integridade do RNA

A avaliação da integridade do RNA total das amostras foi realizada por meio da técnica de eletroforese microfluídica utilizando o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, EUA). Este método é baseado nos princípios tradicionais de eletroforese em gel, porém aplicados em um formato de chip. Moléculas de RNA são eletroforicamente carregadas por um gradiente de voltagem, sendo então separadas por tamanho. O RNA marcado com corante fluorescente é detectado por sensores e os dados são traduzidos em imagens semelhantes a um gel virtual e em gráficos chamados de eletroferogramas. Ao avaliar a

integridade do RNA total na amostra, o programa gera um número de integridade do RNA (RIN). Números de 1 a 10 são utilizados como uma escala de degradação, em que 1 é equivalente a uma amostra totalmente degradada e 10 a uma amostra sem degradação (VITALE, 2016).

2.4.3 Microarranjo

A avaliação do perfil de expressão dos miRNAs foi realizada pela técnica de microarranjo. Para isto, foram utilizadas lâminas de vidro do tipo *G3 Human miRNA Microarray* (G4870C - Agilent Technologies, California, EUA) com capacidade para 8 amostras, contendo 2.549 sequências de miRNAs referentes à versão 21 da base de dados de miRNAs e 21 controles internos. O protocolo foi seguido conforme instruções recomendadas pelo fabricante. Foram utilizadas seis amostras de medula óssea e oito amostras de sangue periférico de pacientes com LLA-B e seis amostras controle. Inicialmente, as amostras de RNA total, armazenadas a -80°C , foram diluídas a fim de obter-se a concentração de $50\text{ ng}/\mu\text{L}$. Em seguida, na etapa de desfosforilação, $2\ \mu\text{L}$ da *mix* contendo a enzima fosfatase foram adicionados a $2\ \mu\text{L}$ das amostras e incubadas em termobloco à 37°C . Posteriormente, as amostras foram desnaturadas com DMSO, incubadas à 100°C e posteriormente transferidas para o banho de gelo e água. A próxima etapa foi de marcação das amostras com a Cianina 3 (Cy3). As amostras foram incubadas a 16°C por 2 h e posteriormente submetidas ao concentrador a vácuo com aquecimento a 50°C até a completa secagem e remoção de resíduos de DMSO. O próximo passo foi solubilizar as amostras em água livre de RNase, e seguir para a etapa de hibridização. Após a adição do *mix* de hibridização, a mistura foi incubada a 100°C por 5 min e imediatamente transferida para o banho de gelo. As amostras foram pipetadas na lâmina de microarranjo e levadas imediatamente para o forno de hibridização a uma temperatura de 55°C , com rotação de 20 rpm por 20:40 horas. Após finalizada a etapa de hibridização, foi realizado o processo de lavagem da lâmina utilizando dois tampões de lavagem. Em seguida, foi realizada a leitura das lâminas utilizando o equipamento *SureScan Microarray Scanner* (G4900DA, Agilent Technologies, California, EUA). Os dados foram extraídos por meio do programa *Feature Extraction* para posterior análise dos miRNAs no programa *Genepring* (G4460-90053 e G5886AA - Agilent Technologies, California, EUA).

2.4.4 PCR Quantitativo

Para a validação dos miRNAs diferencialmente expressos no estudo do microarranjo, foi realizada a técnica de PCR Quantitativa (RT-qPCR), utilizando o aparelho StepOne Real-time PCR 96-well plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Considerando dados referentes a miRNAs descritos na literatura e valores de *Fold Change* (FC) ≥ 2 e $P < 0,05$, foram escolhidos 5 miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo. São eles: hsa-miR-152-3p; hsa-miR-195-5p; hsa-miR-363-3p; hsa-miR-410-3p e hsa-miR-4701-5p. Outros nove miRNAs, já descritos na literatura como diferencialmente expressos e relacionados a LLA, também foram escolhidos. São eles: hsa-miR-27a-3p; hsa-miR-125b-5p; hsa-miR-128-3p; hsa-miR-181a-5p; hsa-miR-181b-5p; hsa-miR-196b-5p; hsa-miR-708-5p; hsa-miR-222-3p; e hsa-miR-223-3p. O Quadro 3 apresenta os miRNAs escolhidos e a sequência de seus respectivos iniciadores, desenhados conforme instruções do kit miRNA QPCR master mix.

Quadro 3 - Seleção dos miRNAs e suas respectivas sequências de iniciadores.

miRNAs	Sequência dos iniciadores	Grupo
hsa-miR-152-3p	TCAGTGCATGACAGAACTTGG	A
hsa-miR-195-5p	TAGCAGCACAGAAATATTGGCG	
hsa-miR-363-3p	GAATTGCACGGTATCCATCTGTA	
hsa-miR-410-3p	GGAATATAACACAGATGGCCTGT	
hsa-miR-4701-5p	CCACCACACCTACCCCTT	
hsa-miR-27a-3p	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC	B
hsa-miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTG	
hsa-miR-128-3p	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT	
hsa-miR-181a-5p	CATTCAACGCTGTCGGTGAGT	
hsa-miR-181b-5p	CATTCATTGCTGTCGGTGGGT	
hsa-miR-196b-5p	TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGG	
hsa-miR-708-5p	GGAGCTTACAATCTAGCTGGG	
hsa-miR-222-3p	GCTACATCTGGCTACTGGGT	
hsa-miR-223-3p	TGTCAGTTTGTCAAATACCCAG	

Nota: Grupo A: miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo e Grupo B: miRNAs diferencialmente expressos com destaque na literatura.

Os miRNAs de referência foram selecionados após análise da estabilidade de expressão de todos os miRNAs detectados no microarranjo utilizando a ferramenta NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004). A expressão dos miRNAs alvo foi normalizada pelo miRNA de referência hsa-miR-26b-5p, pois apresentou maior estabilidade de expressão entre as amostras incluindo pacientes e controles (valor de estabilidade = 0,836).

Previamente à reação da RT-qPCR, iniciou-se a reação de poliadenilação (devido ao tamanho reduzido das moléculas de miRNA) seguida pela reação de síntese da fita de DNA complementar (cDNA), ambas utilizando o *1st-Strand cDNA Synthesis Kit* (Agilent Technologies, California, EUA), no Termociclador PTC-100® (MJ Research - Bio-Rad, Nevada, EUA). As reações de poliadenilação foram realizadas conforme instruções do fabricante em volume final de 20 µL, contendo 100 ng de RNA total e demais reagentes (Quadro 4). As reações foram incubadas a 37°C por 30 min e posteriormente a 95°C por 5 min.

Quadro 4 – Reagentes para a etapa de poliadenilação e seus respectivos volumes.

Reagente	Volume (µL)
Tampão de Polimerase Poly A 5X	4
rATP (10mM)	1
RNA total (contendo 100 ng de RNA)	14
Polimerase Poli A <i>E. coli</i>	1
Volume Final	20

Após esta etapa, 4 µL de amostra da reação de poliadenilação foram utilizadas para a etapa de síntese da fita de DNA complementar (cDNA), adicionando os demais reagentes do kit (Quadro 5). As reações foram incubadas sequencialmente a 55°C por 5 min, 25°C por 15 min, 42°C por 30 min, possibilitando a transcrição reversa da 1ª fita de cDNA e 95°C por 5 min, para finalizar a transcrição reversa.

Quadro 5 – Reagentes utilizados para a síntese de cDNA e seus respectivos volumes.

Reagente	Volume (µL)
Tampão AffinityScript RT 10X	2
Reação de Poliadenilação	4
dNTP mix (100 mM)	0,8
Primer adaptador RT (10 mM)	1
Mistura de enzimas AffinityScript RT/RNase Block	1
H ₂ O livre de RNase	11,2
Volume Final	20

Na etapa da reação da RT-qPCR foi utilizado o kit miRNA QPCR *master mix* (Agilent Technologies, California, EUA), seguindo as recomendações do fabricante (Quadro 6).

Quadro 6 - Reagentes utilizados na reação da RT-qPCR.

Reagente	Volume (μL)
cDNA	1
<i>Master mix</i>	12,5
Corante de referência (diluído 1:50; v/v)	0,375
Iniciador universal antisense (3,125 μM)	1
Iniciador senso específico (3,125 μM)	1
H ₂ O livre de RNase	9,125
Volume Final por Reação	25

Para a reação de amplificação, o seguinte programa foi utilizado: Denaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de denaturação a 95°C por 10 s, hibridização a 53°C por 15 s e extensão a 72°C por 20 s.

Previamente a análise estatística dos dados, a eficiência das reações foi determinada utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). O valor da eficiência da RT-qPCR é uma medida de desempenho global do ensaio em tempo real e geralmente é medida como um valor percentual. Valores de eficiência aceitáveis variam entre 90% a 100% e devem apresentar valores semelhantes entre os alvos e o endógeno escolhido (OLIVEIRA, 2010). Uma eficiência de 100% significa que a quantidade de produtos gerados na reação dobra a cada ciclo da RT-qPCR.

2.4.5 Análise dos dados e testes estatísticos

Para análise dos dados de microarranjo, através do software *Genespring GX* (G5886AA- Agilent Technologies, California, EUA) a avaliação da expressão dos miRNAs foi feita utilizando o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* não pareado com correção de *Westfall-Young*. Foram selecionados miRNAs detectados em 100% das amostras em pelo menos uma das condições apresentadas, considerando valores de *Fold Change* (FC) >2 e valores de $P < 0,001$.

A análise dos dados da PCR quantitativa foi realizada baseada nos dados de expressão relativa calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), em que o Cq (do inglês *quantification cycle*) representa o número de ciclos que o produto amplificado levou para atingir o limiar do sinal de fluorescência detectável. Inicialmente foi calculado o ΔCq de cada amostra, em que o Cq do miRNA em análise foi subtraído do Cq do controle endógeno (miRNA de referência). Posteriormente, foi calculado o $\Delta\Delta\text{Cq}$ (ΔCq do miRNA em análise subtraído da média do ΔCq da amostra controle). A expressão relativa dos miRNAs foi

calculada inserindo o valor do $\Delta\Delta Cq$ de cada miRNA na fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$, em que a base 2 representa a mudança do número de amplicons que duplica a cada ciclo. As análises estatísticas dos dados da PCR quantitativa foram realizadas no software Graphpad Prism® versão 8 utilizando o teste-t não pareado. As diferenças na expressão relativa foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

2.4.6 Análise de Enriquecimento

Os miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes, detectados no microarranjo e na técnica de RT-qPCR, foram submetidos à análise de enriquecimento das vias KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto) através da ferramenta de predição de alvos biológicos DIANA miRPath versão 3 (VLACHOS et al., 2015) utilizando o banco de dados TarBase V.8 (KARAGKOUNI et al., 2018). Foi utilizado o valor de $P \leq 0,05$ e a correção de FDR (do inglês *False Discovery Rate*) no modo união de genes. O KEGG é uma base de dados que contém informações sobre funções e mecanismos moleculares de diversos sistemas biológicos, a partir de dados gerados por sequenciamento do genoma entre outras tecnologias experimentais. O DIANA miRPath é um software online dedicado ao estudo do papel regulatório dos miRNAs e a identificação de vias controladas.

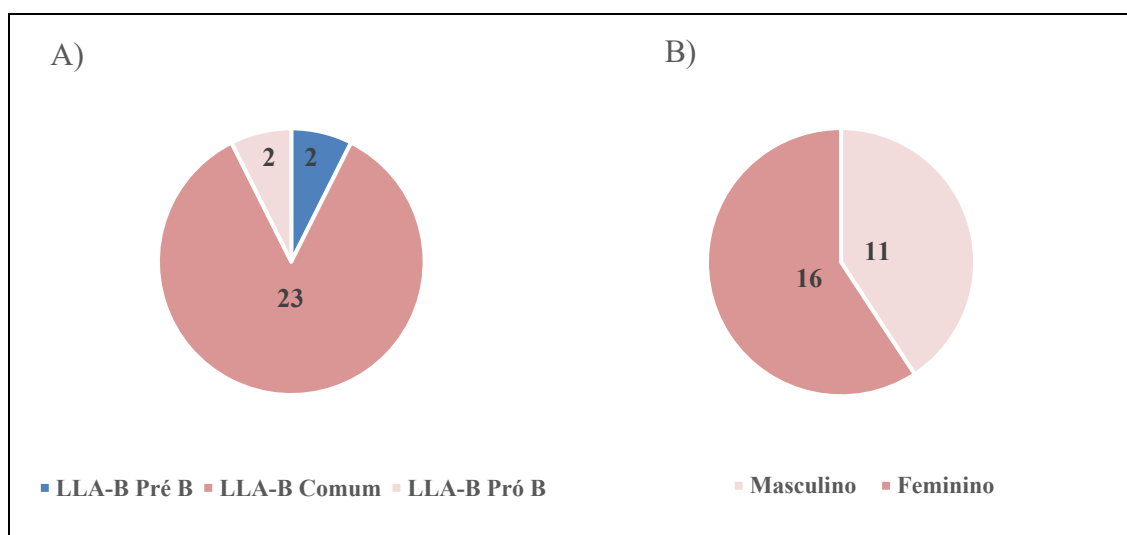
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PACIENTES

Amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) foram coletadas de pacientes diagnosticados com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) a partir de fevereiro de 2017, conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. Dos 182 pacientes coletados, apenas 27 foram considerados para este estudo, pois após a realização de exames complementares verificou-se que os demais pacientes já estavam em tratamento quimioterápico ou foram diagnosticados com outros tipos de neoplasias diferentes de LLA-B.

De um total de 27 pacientes recrutados, 11 foram submetidos à coleta de amostras de sangue periférico e de medula óssea. Dos demais 16 pacientes, foi coletado apenas sangue periférico, pois não foi possível a coleta da medula óssea. Dos 27 pacientes com diagnóstico de LLA-B, 23 (85,2%) foram diagnosticados com LLA-B Comum, 02 pacientes (7,4%) com LLA Pré-B e 02 pacientes (7,4%) com LLA Pró-B (Figura 5A). A faixa etária variou entre 11 meses e 14 anos e 59,26% (N=16) são do sexo feminino (Figura 5B). O Quadro 7 e a Figura 5 resumem as principais características dos pacientes, compreendendo: sexo, idade ao diagnóstico e subtipo de LLA-B, conforme classificação imunofenotípica.

Figura 5 - Dados relacionados ao subtipo de LLA-B e sexo dos pacientes.



Nota: Número de casos de LLA-B Pré B, LLA-B Comum e LLA-B Pró B (A); número de pacientes do sexo masculino e feminino (B).

Quadro 7 - Dados relacionados ao subtipo de LLA-B e sexo dos pacientes.

Paciente	Sexo	Idade em Anos	Tipo de LLA-B
P1	F	12	LLA-B Comum
P2	F	07	LLA-B Pré B
P3	F	04	LLA-B Comum
P4	M	01	LLA-B Pró B
P5	M	03	LLA-B Comum
P6	M	14	LLA-B Comum
P7	F	02	LLA-B Comum
P8	F	03	LLA-B Comum
P9	M	01	LLA-B Pré B
P10	F	05	LLA-B Comum
P11	F	11	LLA-B Comum
P12	F	11	LLA-B Comum
P13	M	03	LLA-B Comum
P14	F	13	LLA-B Comum
P15	M	04	LLA-B Comum
P16	M	02	LLA-B Comum
P17	F	00*	LLA-B Pró B
P18	F	03	LLA-B Comum
P19	F	06	LLA-B Comum
P20	F	04	LLA-B Comum
P21	F	02	LLA-B Comum
P22	F	03	LLA-B Comum
P23	M	05	LLA-B Comum
P24	F	06	LLA-B Comum
P25	M	07	LLA-B Comum
P26	M	03	LLA-B Comum
P27	M	02	LLA-B Comum

Nota: *11 meses.

3.2 LEVANTAMENTO DOS DADOS COMPLEMENTARES

Dos prontuários, foram coletados dados provenientes de resultados de exames complementares, os quais são realizados como rotina para o diagnóstico. Exames de imunofenotipagem, mielograma e hemograma foram avaliados com relação à porcentagem de blastos. Apesar da possibilidade do uso de sangue periférico na imunofenotipagem, amostras de medula óssea foram utilizadas como primeira opção em 85,2% dos casos. Quando não era possível a punção da medula óssea, procedia-se à coleta de sangue periférico. A Tabela 1 resume os dados de porcentagem de blastos dos vinte e sete pacientes coletados, segundo resultados de imunofenotipagem, mielograma e hemograma.

Tabela 1 - Porcentagem de blastos encontrados nos pacientes, segundo o tipo de exame.

Paciente	Diagnóstico	Imunofenotipagem	Mielograma	Hemograma
P01	LLA-B Comum	93% MO	90,4%	62%
P02	LLA-PréB	87% MO	92%	36%
P03	LLA-B Comum	72% MO	38,4% *	**
P04	LLA-B Pró-B	82% MO	86%	15%
P05	LLA-B Comum	82% MO	90,8%	9%
P06	LLA-B Comum	1ª coleta: 44% SP 2ª coleta: 91% MO	93,6%	58%
P07	LLA-B Comum	1ª coleta: 76% SP 2ª coleta: 93% MO	93,6%	81% ***
P08	LLA-B Comum	50% SP/90% MO	92,4%	59% ***
P09	LLA-B Pré-B	79% MO	80,8%	9% ***
P10	LLA-B Comum	86% MO	91,2%	6% ***
P11	LLA-B Comum	92% - MO	94%	89% ****
P12	LLA-B Comum	92% MO	86%	69%
P13	LLA-B Comum	1ª coleta: 82% SP 2ª coleta: 91,6% MO	86%	91%
P14	LLA-B Comum	88,5% SP	-	72%
P15	LLA-B Comum	53% SP	-	52% *****
P16	LLA-B Comum	92% MO	94,4%	3%*****
P17	LLA-B Pró-B	1ª coleta: 89,5% SP 2ª coleta: 88% MO	91,6%	88%
P18	LLA-B Comum	88% MO	44%	27%
P19	LLA-B Comum	86,8% MO		
P20	LLA-B Comum	-	-	48%
P21	LLA-B Comum	0,4% SP	-	3%
P22	LLA-B Comum	55% MO	82%	35%
P23	LLA-B Comum	84,5% - MO	92,4%	26%
P24	LLA-B Comum	93,7% MO	93,6%	67%
P26	LLA-B Comum	83% MO	90,8%	38%
P27	LLA-B Comum	73,3% MO	93,2%	49%

Nota: MO – Medula Óssea; SP – Sangue Periférico; * células de pequeno e médio tamanho, cromatina imatura e nucléolo pouco evidente; ** não foram identificados blastos na amostra; *** células anormais de médio a grande tamanho, alta relação núcleo/citoplasma (N/C), citoplasma escasso e basofílico, cromatina imatura e nucléolos pouco evidentes; **** células anormais, de médio a grande tamanho, alta relação N/C, citoplasma basofílico, cromatina imatura e nucléolos evidentes; ***** células anormais, de médio a grande tamanho, alta relação N/C, citoplasma escasso e basofílico, cromatina imatura e presença de nucléolos; ***** linfócitos atípicos, não foram identificados blastos na amostra.

Dos 27 pacientes, apenas 2 não apresentaram blastos no sangue periférico. As maiores porcentagens de blastos foram encontradas nos exames de imunofenotipagem e no mielograma. Em relação às alterações genéticas encontradas nestes pacientes, foram analisados os resultados de exames de citogenética convencional e de biologia molecular pela técnica de PCR qualitativo para três translocações: t(9;22) – BCR-ABL; t(1;19) - E2A/PBX1 e t(12;21) - TEL/AML1, cujas coletas foram realizadas na mesma data de coleta das amostras deste estudo. No Quadro

8 apresentam-se as alterações genéticas encontradas nas amostras dos pacientes assim como o valor prognóstico associado a elas.

Quadro 8 - Alterações genéticas encontradas nos pacientes.

Paciente	Tipo de LLA	Citogenética/ Rearranjos	Prognóstico
P01	LLA B Comum	47,XX,+8[12]	*
P02	LLA-B Pré-B	46,XX[10]	-
P03	LLA B Comum	Tetraploidia[03]/46,XX[16]	*
P04	LLA-B Pré-B	46,XY[15]	-
P05	LLA B Comum	Ausência de Metáfases	-
P06	LLA B Comum	53,XY,t(1;?9)~(p13;p12),+6,+7,+8,+14,+17,+?21,+X[08]	Favorável
P07	LLA B Comum	Inconclusivo	-
P08	LLA B Comum	Inconclusivo	-
P09	LLA B Pré B	46,XY[15]	-
P10	LLA B Comum	Inconclusivo	-
P11	LLA B Comum	46,XX[12]	-
P12	LLA B Comum	t(1;19)[06]/46,XX[06] Rearranjo E2A/PBX1	Desfavorável
P13	LLA B Comum	Inconclusivo Rearranjo TEL/AML1	Favorável
P14	LLA B Comum	46,XX[20]	-
P15	LLA B Comum	46,XY[20]	-
P16	LLA B Comum	Inconclusivo	-
P17	LLA-B Pré-B	46,XX[15]	-
P18	LLA B Comum	Poliploidia[04]/46,XX[16]	*
P19	LLA B Comum	-	-
P20	LLA B Comum	46,XX[14]	-
P21	LLA B Comum	-	-
P22	LLA B Comum	46,XX[20]	-
P23	LLA B Comum	46,XY[20]	-
P24	LLA B Comum	46,XX[06]	-
P25	LLA B Comum	46,XY[20]	-
P26	LLA B Comum	46,XY[20]	-
P27	LLA B Comum	Tetraploidia[04]/46,XY[16]	*

Nota: *Alteração com prognóstico não descrito ou ainda não definido pela literatura.

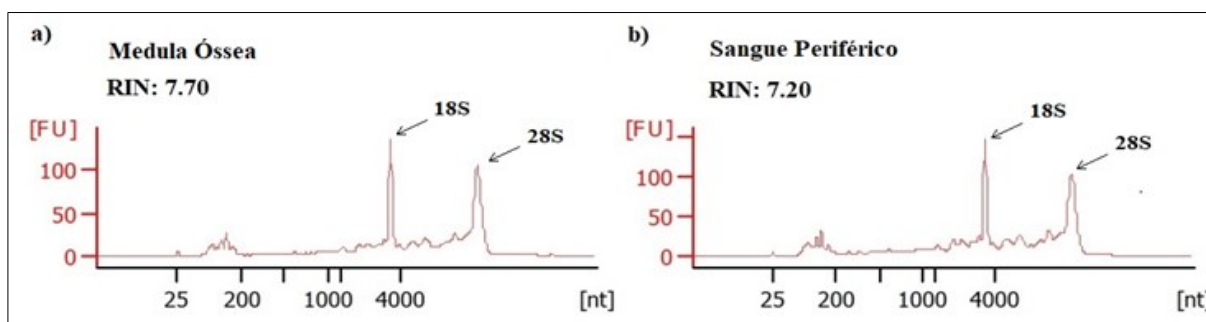
Entre os 27 pacientes, 25 apresentaram exames complementares coletados na mesma data. Em relação à citogenética, dos 25 pacientes que realizaram o exame, 6 apresentaram alterações, 4 foram inconclusivos, 1 não apresentou metáfases e os demais apresentaram resultado normal. Pelo fato de muitas anormalidades cromossômicas definirem características clínicas e prognósticas, são consideradas como entidades distintas; por exemplo, o paciente P06, o qual apresenta LLA com hiperdiploidia. A presença de células hiperdiploides, ou seja, com mais de 50 cromossomos, observada no paciente P06, confere prognóstico favorável ao

paciente. A trissomia do cromossomo 8, presente no paciente P01, é rara em LLA (5%) e raramente encontrada como uma anomalia isolada (DESSEN P, 2009). A translocação t(1;19)(q23;p13.3) visualizada no paciente P12 é associada a um prognóstico ruim. Entretanto, com os protocolos terapêuticos atuais, este dado nem sempre corrobora a prática e o que vem sendo observado é um possível risco relativo aumentado de recidiva no sistema nervoso central (SNC) (SWERDLOW et al., 2017). Em relação aos exames de biologia molecular por PCR qualitativo, apenas 2 pacientes apresentaram alterações, sendo 1 com a fusão dos genes TEL/AML1 (paciente P13), ou seja, apresentando a t(12;21), a qual indica prognóstico favorável ao paciente, e o outro com a fusão dos genes E2A/PBX1, apresentando a t(1;19), já citado anteriormente (SWERDLOW et al., 2017).

3.3 QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO RNA

As concentrações de RNA total determinadas pelo equipamento Nanovue variaram de 7,1 ng/ μ L a 208 ng/ μ L (APÊNDICE A), possibilitando o uso de 100 ng de RNA total na etapa seguinte de poliadenilação, de acordo com os valores recomendados pelo kit (30ng a 1 μ g). A integridade das amostras, verificada pelo equipamento Bioanalyzer, foi demonstrada através de eletroferogramas e pelo número de integridade do RNA (RIN) (APÊNDICE A). A Figura 6 apresenta 2 eletroferogramas de amostras de medula óssea e de sangue periférico, de um mesmo paciente, cujos valores de RIN foram de 7.70 e 7.20 respectivamente. Neles é possível observar os picos referentes aos RNAs ribossomais (rRNA) 18S e 28S.

Figura 6 – Integridade do RNA total em amostras de medula óssea e sangue periférico.



Nota: Eletroferogramas representando a integridade do RNA total de amostras de medula óssea (a) e sangue periférico (b) do mesmo paciente. As setas mostram os picos dos RNAs ribossomais 18S e 28S.

3.4 MICROARRANJO

Através da técnica de microarranjo, foi realizada a análise da expressão dos miRNAs presentes nas amostras. Com o auxílio dos testes estatísticos aplicados, foram identificados os miRNAs detectados e diferencialmente expressos em amostras de pacientes com LLA-B comparados a amostras controle. Para isto foram avaliadas amostras de sangue periférico e de medula óssea de 8 pacientes e amostras de sangue periférico de 6 indivíduos controle (livres de leucemia ou de qualquer doença hematológica diagnosticada até o momento da coleta), conforme Quadro 9. Nos pacientes de número P14SP e P17SP não foi possível obter amostra de medula óssea.

Quadro 9 - Amostras utilizadas nas lâminas de Microarranjo.

Pacientes		Controle
Medula Óssea	Sangue Periférico	
P01MO	P01SP	C1
P04MO	P04SP	C5
P05MO	P05SP	C6
P07MO	P07SP	C7
P08MO	P08SP	C8
P09MO	P09SP	C9
-	P14SP	-
-	P17SP	-

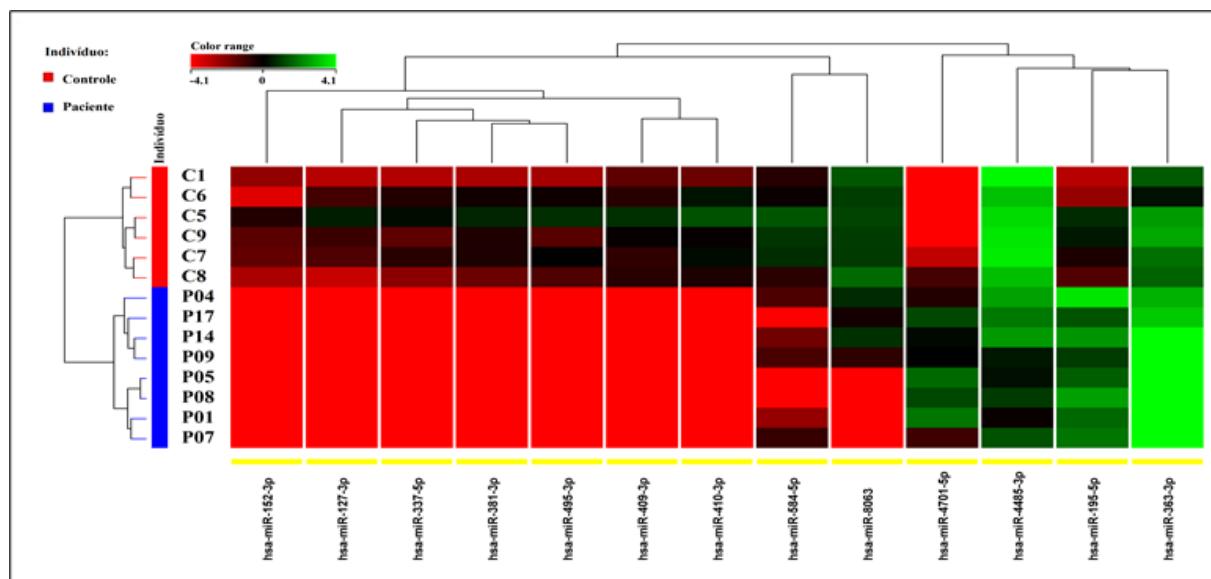
Nota: MO: medula óssea; SP: sangue periférico; P: paciente; C: controle.

Em uma primeira análise, foi verificado se existia diferença nos perfis de expressão dos miRNAs entre as amostras de sangue periférico e as de medula óssea dos mesmos pacientes com LLA-B. Utilizando o teste estatístico não-paramétrico *Mann Whitney* não-pareado, associado ao teste de correção de *Westfall Young*, não foram encontrados miRNAs diferencialmente expressos comparando amostras de sangue periférico com medula óssea nos seis pacientes avaliados ($P < 0,001$ e $FC > 2$). Nemes e colaboradores (2014) também não encontraram diferença significativa no perfil de expressão de miRNAs entre amostras de medula óssea e de sangue periférico derivadas de um mesmo paciente (NEMES et al., 2014). A presença de blastos tanto na medula óssea, quanto no sangue periférico poderia justificar este achado. Weinkauff e colaboradores (1999) ao avaliar amostras de pacientes com leucemia aguda, encontrou características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas semelhantes entre blastos de sangue periférico e de medula óssea. Os dados apresentados por este autor sugerem que uma amostra de sangue periférico com 30% ou mais de blastos é adequada para o

diagnóstico da leucemia aguda (WEINKAUFF et al., 1999). Já Duyu e colaboradores (2014) verificaram em seus resultados que os miRNAs significantes no sangue periférico foram diferentes dos miRNAs da medula óssea, quando comparados aos indivíduos sem leucemia e por esta razão acreditam que a medula óssea reflete o processo leucêmico de forma mais eficiente quando comparada ao sangue periférico. (DUYU et al., 2014).

Após a verificação de equivalência entre os perfis de expressão de miRNAs comparando amostras dos mesmos pacientes, as amostras de sangue periférico de pacientes com LLA-B foram comparadas às amostras de sangue de indivíduos controle, considerando valores de FC >2 e P<0,05. Foram identificados 13 miRNAs diferencialmente expressos: miR-127-3p; miR-152-3p; miR-195-5p; miR-337-5p; miR-363-3p; miR-381-3p; miR-409-3p; miR-410-3p; miR-4485-3p; miR-4701-5p; miR-495-3p; miR-584-5p e miR-8063. A Figura 7 mostra o mapa de calor representando o grau de intensidade de expressão destes 13 miRNAs.

Figura 7 – Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos em amostras de sangue periférico de pacientes comparados aos dados dos indivíduos controle.



Nota: Mapa de calor representando os valores de intensidade de expressão dos 13 miRNAs diferencialmente expressos (FC > 2 e P < 0,05) comparando amostras de sangue periférico entre pacientes (P) e indivíduos controle (C). As cores vermelho, preto e verde indicam respectivamente ausência de expressão, baixa expressão e alta expressão dos miRNAs.

Para melhor visualização dos dados, a Tabela 2 apresenta os 13 miRNAs diferencialmente expressos, os respectivos valores de FC e o status de expressão. O termo *Upregulated* foi utilizado para caracterizar os miRNAs com regulação positiva, ou seja, os que

apresentaram aumento da expressão, e o termo *Downregulated* para os miRNAs com regulação negativa, ou diminuição da expressão.

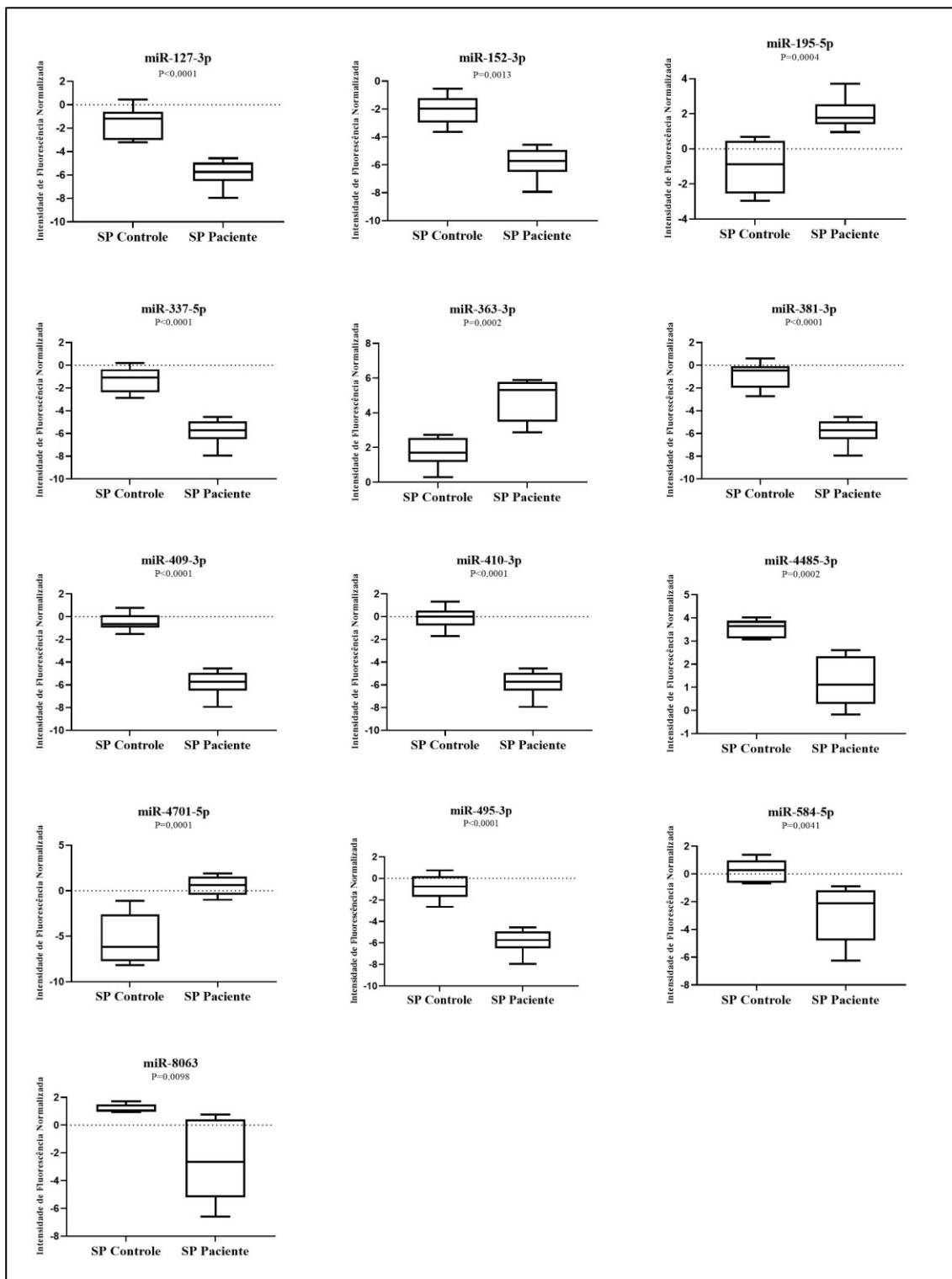
Tabela 2 - miRNAs diferencialmente expressos nas amostras de sangue periférico entre pacientes e indivíduos controle.

miRNA	(FC)	Status de Expressão
hsa-miR-127-3p	20,44	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-152-3p	13,88	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-195-5p	8,11	<i>Upregulated</i>
hsa-miR-337-5p	23,95	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-363-3p	8,34	<i>Upregulated</i>
hsa-miR-381-3p	31,95	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-409-3p	40,99	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-410-3p	54,08	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-4485-3p	5,07	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-4701-5p	61,82	<i>Upregulated</i>
hsa-miR-495-3p	33,17	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-584-5p	8,90	<i>Downregulated</i>
hsa-miR-8063	13,97	<i>Downregulated</i>

Nota: FC: Valores de *Fold Change*, status de expressão *Upregulated*: miRNAs com expressão aumentada e *Downregulated*: miRNAs com expressão diminuída. $P < 0,001$. Os miRNAs em negrito foram escolhidos para validação por RT-qPCR.

Como pode ser observado na Tabela 4, dez miRNAs apresentaram-se *Downregulated* (miR-127-3p; miR-152-3p; miR-337-5p; miR-381-3p; miR-409-3p; miR-410-3p; miR-4485-3p; miR-495-3p; miR-584-5p e miR-8063) e três apresentaram-se *Upregulated* (miR-195-5p; miR-363-3p e miR-4701-5p). A Figura 8 apresenta os gráficos *Box Plot* referentes à expressão de cada miRNA, comparando a intensidade de fluorescência normalizada das amostras de sangue periférico de pacientes com LLA-B com amostras de sangue periférico de indivíduos controle. É possível observar que os miRNAs: miR-195-5p, miR-363-3p e miR-4701-5p apresentaram mediana da intensidade de fluorescência normalizada maior nos pacientes comparando-se com os dados dos indivíduos controle e correspondem aos três miRNAs *Upregulated*. Os demais miRNAs apresentaram intensidade de fluorescência normalizada menor nos pacientes e correspondem aos *Downregulated*.

Figura 8 - Expressão dos miRNAs em amostras de sangue periférico, comparando pacientes com indivíduos controle.



Nota: SP: sangue periférico. Perfil de expressão dos miRNAs: miR-127-3p (A); miR-152-3p (B); miR-195-5p (C); miR-337-5p (D); miR-363-3p (E); miR-381-3p (F); miR-409-3p (G); miR-410-3p (H); miR-4485-3p (I); miR-4701-5p (J); miR-495-3p (K); miR-584-5p (L); miR-8063 (M). As caixas representam a distribuição de 50% dos valores de intensidade de fluorescência normalizados obtidos por microarranjo e a mediana é mostrada pela linha horizontal dentro das caixas dos gráficos.

O miR-127-3p, o qual apresentou-se *Downregulated* neste estudo, foi descrito previamente na literatura com expressão reduzida em pacientes com LLA-B. No estudo conduzido por Schotte e colaboradores (2011) foi observado que a expressão de miR-127-3p foi 140 vezes mais baixa em pacientes com LLA-B precursora quando comparado a células controle CD34⁺ (GROBBELAAR; FORD, 2019; SCHOTTE et al., 2011b), corroborando os achados deste estudo. O miR-195-5p cujo perfil de expressão apresentou-se aumentado em nosso estudo, foi previamente descrito na literatura como *Upregulated* em amostras de LLA-B infantil (DUYU et al., 2014). O miR-410-3p apresentou um perfil de expressão diferente do perfil relatado na literatura. Este miRNA foi descrito por Qi e colaboradores (2018) como *Upregulated* em amostras de medula óssea de pacientes com LLA infantil não especificada (QI et al., 2018). Em relação ao miR-152-3p, um estudo conduzido por Stumpel e colaboradores (2011) verificou que este miRNA foi significativamente *Downregulated* em amostras de medula óssea de crianças com LLA positivas para a translocação t(4;11), quando comparadas a amostras controle (STUMPEL et al., 2011), corroborando o perfil encontrado em nosso estudo. Em relação ao miR-495-3p, não foram encontrados estudos relacionados a LLA-B infantil. Um estudo relacionado a LMA verificou que o miR-495-3p foi significativamente *Downregulated* em amostras de LMA com rearranjo no gene *MLL* em comparação com amostras controle (JIANG et al., 2012). Da mesma forma, não foram encontrados dados na literatura relacionados a LLA-B infantil em relação ao miR-409-3p e ao miR-381-3p. Estudos relacionados a LMA, verificaram a expressão reduzida do miR-381-3p em amostras de soro e de medula óssea de pacientes pediátricos (ZHANG et al., 2020) e a baixa expressão do miR-409-3p associada a um risco aumentado de recidiva para esta neoplasia (DÍAZ-BEYÁ et al., 2014). Em relação ao miR-363-3p, também não foram encontrados estudos relacionados a LLA-B infantil. Um estudo verificou que este miRNA apresentou-se *Upregulated* em amostras de medula óssea de pacientes com LLA-T infantil (DAWIDOWSKA et al., 2019). Em relação aos miRNAs miR-337-5p; miR-4485-3p; miR-4701-5p; miR-584-5p e miR-8063 não foram encontrados dados na literatura avaliando o status de expressão na LLA-B. Estes miRNAs ainda não descritos na literatura como relacionados a LLA-B, são achados inéditos neste trabalho, demonstrando a necessidade de mais investigações na busca por novos biomarcadores. Os miR-152-3p, miR-195-5p, miR-363-3p, miR-410-3p e miR-4701-5p foram escolhidos para validação por RTq-PCR e serão discutidos mais à frente em um item a parte.

3.5 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO

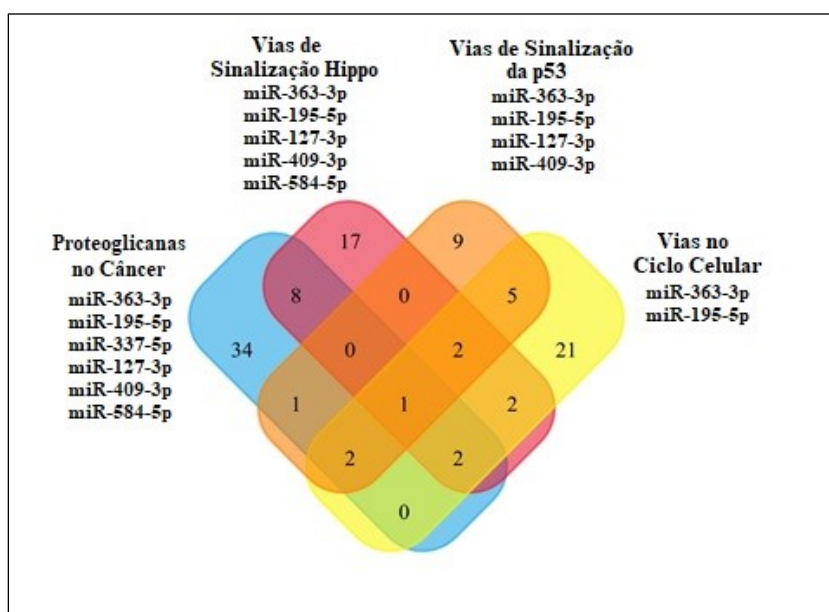
Os 13 miRNAs, detectados no microarranjo como diferencialmente expressos nos pacientes, foram submetidos a análise de enriquecimento das vias KEGG. Das 31 vias enriquecidas resultantes, destacam-se a via das proteoglicanas no câncer (com 48 genes e 6 miRNAs envolvidos), via de sinalização Hippo (32 genes e 5 miRNAs), vias no ciclo celular (35 genes e 2 miRNAs) e vias de sinalização da p53 (20 genes e 4 miRNAs) (Tabela 3). As vias selecionadas destacam-se por apresentar relação direta com mecanismos celulares relacionados ao desenvolvimento do câncer, como a proliferação celular e apoptose.

Tabela 3 – Vias KEGG enriquecidas

Vias KEGG	Valor de P	Genes	miRNAs
<i>Proteoglycans in cancer (hsa05205)</i>	4.943E ⁻⁰⁶	48	6
<i>Hippo signaling pathway (hsa04390)</i>	0.0003	32	5
<i>Cell cycle (hsa04110)</i>	0.0034	35	2
<i>p53 signaling pathway (hsa04115)</i>	0.0062	20	4

A Figura 9 representa o número de genes em comum envolvidos nas principais vias enriquecidas, geradas a partir dos miRNAs detectados no microarranjo.

Figura 9 – Diagrama de Venn do número de genes envolvidos e os miRNAs presentes nas 4 vias KEGG destacadas.



Dos 13 miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo, 6 estiveram relacionados às vias enriquecidas. São eles: miR-363-3p, miR-195-5p, miR-337-5p, miR-127-3p, miR-409-3p e miR-584-5p. Os genes regulados pelos miRNAs envolvidos nas vias destacadas são descritos no Quadro 10.

Quadro 10 – Genes e miRNAs envolvidos nas vias metabólicas destacadas.

Vias Metabólicas	Genes	miRNAs
Vias das proteoglicanos no câncer	<i>BRAF, ACTB, STAT3, PDCD4, SMAD2, THBS1, PPP1CC, MAPK14, ACTG1, FRS2, FZD6, ITGA5, WNT2B, IGF1R, KRAS, RRAS2, MSN, HSPG2, ITGAV, CCND1, CTNNB1, HIF1A, MYC, MMP9, CBLC, PRKACA, FLNA, DDX5, FGF2, CDC42, LUM, PPP1R12C, PRKCB, AKT3, WNT3A, PIK3CA, SDC2, CDKN1A, SDC4, VMP1, HGF, VEGFA, ITPR2, PLAU, GRB2, MDM2, WNT9A, CD44</i>	miR-363-3p miR-195-5p miR-337-5p miR-127-3p miR-409-3p miR-584-5p
Via de sinalização Hippo	<i>ACTB, DVL3, YAPI, SMAD2, BTRC, PPP2CA, NF2, YWHAG, PPP1CC, CCND2, ACTG1, GLI2, FZD6, WNT2B, BIRC5, YWHAB, AMOT, CDH1, CCND1, CTNNB1, MYC, PPP2R1A, PPP2CB, WNT3A, SMAD7, LATS1, PPP2R1B, PARD6B, INADL, WNT9A, CCND3, CTGF</i>	miR-363-3p miR-195-5p miR-127-3p miR-409-3p miR-584-5p
Vias no ciclo celular	<i>RBL2, PCNA, CDK4, SMAD2, CDC14A, CCNA2, MCM6, YWHAG, CCND2, SMC3, CDKN1B, CUL1, YWHAB, WEE1, CDK6, CHEK1, CCND1, CCNE2, E2F3, MYC, RBL1, TTK, CDC7, EP300, CCNE1, CDC27, CDKN1A, PRKDC, PLK1, ANAPC13, CREBBP, RAD21, MDM2, CCND3, CDC25A</i>	miR-363-3p miR-195-5p
Vias de sinalização da p53	<i>ZMAT3, CDK4, THBS1, CCND2, RRM2B, CDK6, CHEK1, CCND1, CCNE2, SHISA5, SESN1, TNFRSF10B, CCNE1, IGFBP3, CDKN1A, SESN3, CCNG2, PIDD1, MDM2, CCND3</i>	miR-363-3p miR-195-5p miR-127-3p miR-409-3p

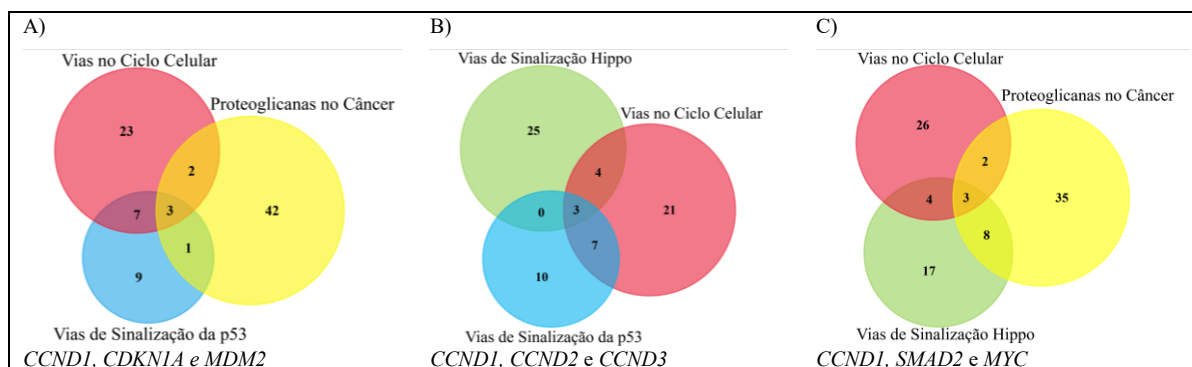
Nota: O gene *CCND1*, destacado em negrito, é o único presente nas quatro vias metabólicas.

De todos os genes destacados, um deles (*CCND1*) aparece envolvido nas quatro vias selecionadas (destacado em negrito no Quadro 10). A ciclina D1 (*CCND1*) é um importante regulador da progressão do ciclo celular, envolvida principalmente na transição da fase G1 intermediária para a fase tardia (JONG KYONG; ALAN DIEHL, 2009). Ao formar um complexo proteico com a cinase dependente de ciclina CDK4 ou CDK6, *CCND1* fosforila a proteína retinoblastoma (pRb). A pRb fosforilada libera o fator de transcrição E2F, o qual ativa a transcrição de genes associados a entrada na fase S do ciclo celular (ORTEGA; MALUMBRES; BARBACID, 2002). A superexpressão de *CCND1* interfere no processo

normal do ciclo celular e possivelmente promove o desenvolvimento e a progressão de cânceres, incluindo LLA infantil (XUE et al., 2015).

Ao realizarmos combinações de três vias, é possível identificar alguns genes em comum entre elas. A Figura 10 apresenta estas diferentes combinações e seus respectivos genes em comum.

Figura 10 – Diagramas de Venn dos genes em comum entre as combinações de três vias enriquecidas.



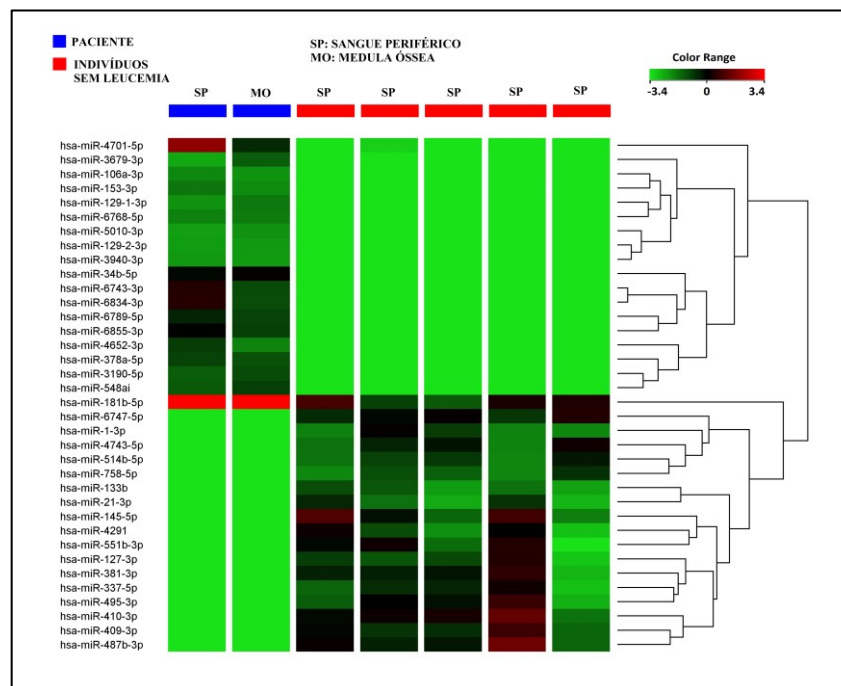
Nota: A) Genes em comum entre as vias de sinalização da p53, das proteoglicanas no câncer e no ciclo celular, B) Genes em comum entre as vias de sinalização da p53, no ciclo celular e de sinalização Hippo, C) Genes em comum entre as vias de sinalização Hippo, das proteoglicanas no câncer e vias relacionadas ao ciclo celular.

Os genes apresentados na Figura 10 têm destaque como reguladores da proliferação celular. O gene *CDKN1A* codifica a proteína p21, que por sua vez atua como um potente inibidor da atividade dos complexos ciclina-CDK e regulador da progressão do ciclo celular nas fases G1 e S (GARTEL; RADHAKRISHNAN, 2005). A proteína codificada pelo oncogene *MDM2* regula negativamente a proteína supressora tumoral p53, ligando-se a ela e transportando-a do núcleo para o citoplasma, onde é degradada (ALARCON-VARGAS; RONAI, 2002). *CCND2* e *CCND3* fazem parte de uma grande família de ciclinas altamente conservada e atuam de modo semelhante ao *CCND1* e são peças chave na transição das fases G1/S do ciclo celular. O gene *SMAD2* codifica uma proteína transdutora de sinal e moduladora transcricional atuante em várias vias de sinalização. SMAD associa-se ao fator de crescimento TGF-beta e, portanto, regula processos celulares, como proliferação e diferenciação celular e apoptose (GIROLAMI et al., 2019). Alguns genes da família de oncogenes *MYC* são superexpressos em uma variedade de cânceres humanos (FARIA; RABENHORST, 2006) e suas proteínas atuam como fatores de transcrição associados à proliferação, diferenciação, progressão do ciclo celular e apoptose (HUTTER et al., 2017).

3.6 PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAs NA TRISSOMIA DO 8:

Um dos pacientes avaliados neste estudo apresentou uma alteração citogenética não constitucional comum em leucemias de linhagem mieloide, porém muito rara em LLA (47,XX,+8) e por esta razão foi submetido a análise de expressão de miRNAs de forma isolada. Através da técnica de microarranjo, foram observados 36 miRNAs diferencialmente expressos neste paciente comparado a amostras de sangue periférico de indivíduos sem leucemia ($P < 0.001$, $FC > 2.0$). A Figura 11 mostra o mapa de calor representando o grau de intensidade de expressão destes 36 miRNAs.

Figura 11 – Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos em amostras do paciente com trissomia 8 comparado aos indivíduos controle.



Destes miRNAs, apenas dois foram descritos na literatura relacionados a LLA-B (miR-181b-5p e miR-133b). O miR-181b-5p, cujo perfil de expressão foi *upregulated* neste paciente, também apresentou-se superexpresso em amostras de plasma e de sangue periférico de pacientes com LLA infantil (COCCÉ et al., 2015; RAMANI et al., 2017). De modo contrário, o miR-133b, o qual foi *downregulated* neste paciente, apresentou-se *upregulated* em amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com LLA-B infantil (RAMANI et al., 2017). Nenhum dos miRNAs localizados no cromossomo 8 apresentaram-se *upregulated*. Este achado indica que a trissomia 8 não resulta necessariamente em aumento da expressão de miRNAs

presentes neste cromossomo e que a duplicação do cromossomo 8 pode estar associada a mudanças globais nos padrões de expressão gênica.

3.7 PCR QUANTITATIVO

Dos 13 miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo, cinco foram selecionados para validação por meio da técnica de RT-qPCR (miR-152-3p, miR-195-5p, miR-363-3p, miR-410-3p e miR-4701-5p), baseados nos respectivos status de expressão (*Up* ou *Downregulated*) e valores de FC>2. Além destes, os miRNAs: miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p, miR-27a-3p, miR-125b-5p e miR-223-3p também foram testados, baseados em achados na literatura, discutidos posteriormente. Para que os resultados do cálculo da análise de expressão relativa utilizando o método $\Delta\Delta CT$ sejam consistentes, a eficiência das reações de amplificação da RT-qPCR foram avaliadas e mostraram resultados entre 90 e 94% (Tabela 4).

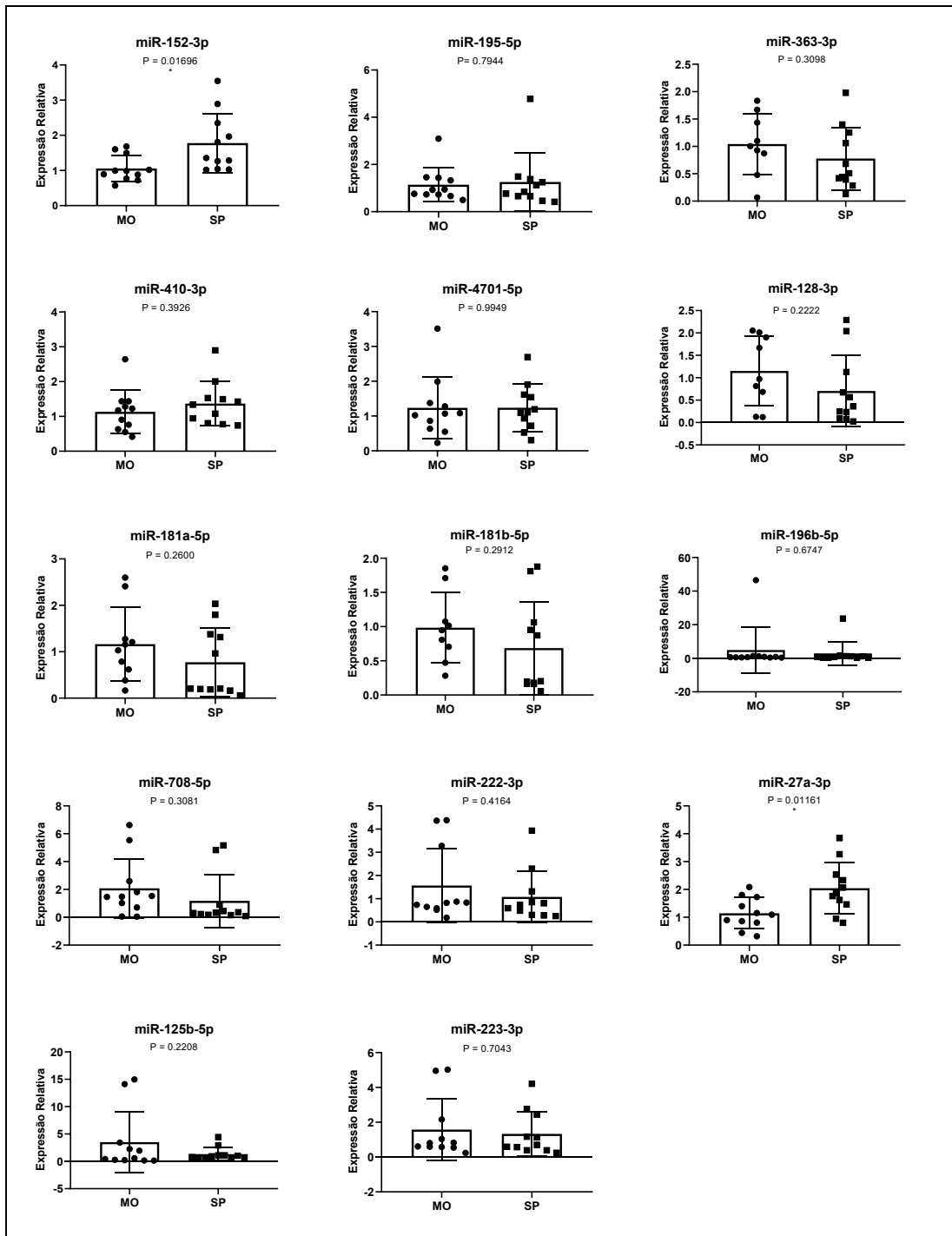
Tabela 4 – Eficiências das reações de RT-qPCR dos miRNAs alvos.

miRNAs	Eficiência (%)	miRNAs	Eficiência (%)
miR-16-5p	91	miR-196b-5p	92
miR-26b-5p (*)	92	miR-222-3p	91
miR-27a-3p	91	miR-223-3p	90
miR-125b-5p	91	miR-363-3p	90
miR-127-3p	91	miR-410-3p	90
miR-128-3p	94	miR-708-5p	90
miR-152-3p	91	miR-4701-5p	90
miR-181b-5p	91	miR-30e-5p	90
miR-195-5p	90	miR-181a-5p	93

Nota: (*) Controle endógeno.

Após verificação da eficiência das reações, foi realizada a análise de expressão relativa dos miRNAs comparando amostras de medula óssea em relação as de sangue periférico dos pacientes, cujos resultados estão demonstrados na Figura 12. É possível observar que não houve diferença significativa ($P<0,05$) entre as amostras em 12 dos 14 miRNAs avaliados (miR-195-5p, miR-363-3p, miR-410-3p, miR-4701-5p, miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p, miR-125b-5p e miR-223-3p), corroborando em parte os achados do microarranjo.

Figura 12 – Perfil de expressão dos miRNAs em amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes com LLA-B.



Nota: MO: medula óssea, SP: sangue periférico. Os asteriscos indicam as diferenças estatísticas entre os grupos (Teste-t não pareado; * P<0,05)

Este estudo busca somente os miRNAs com expressão equivalente entre amostras de sangue periférico e de medula óssea, vislumbrando a busca por biomarcadores no sangue periférico. Os miRNAs miR-152-3p e miR-27a-3p apresentaram diferença significativa no perfil de expressão entre amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes com LLA-B (P

= 0,0169 e $P = 0,0116$ respectivamente) e por esta razão foram desconsiderados nas análises posteriores. Esta diferença pode ser devido ao número de amostras de medula óssea e de sangue periférico utilizados na técnica do microarranjo ($N=6$), comparado a técnica da RT-qPCR ($N=11$). A Tabela 5 apresenta os valores de P resultantes desta comparação.

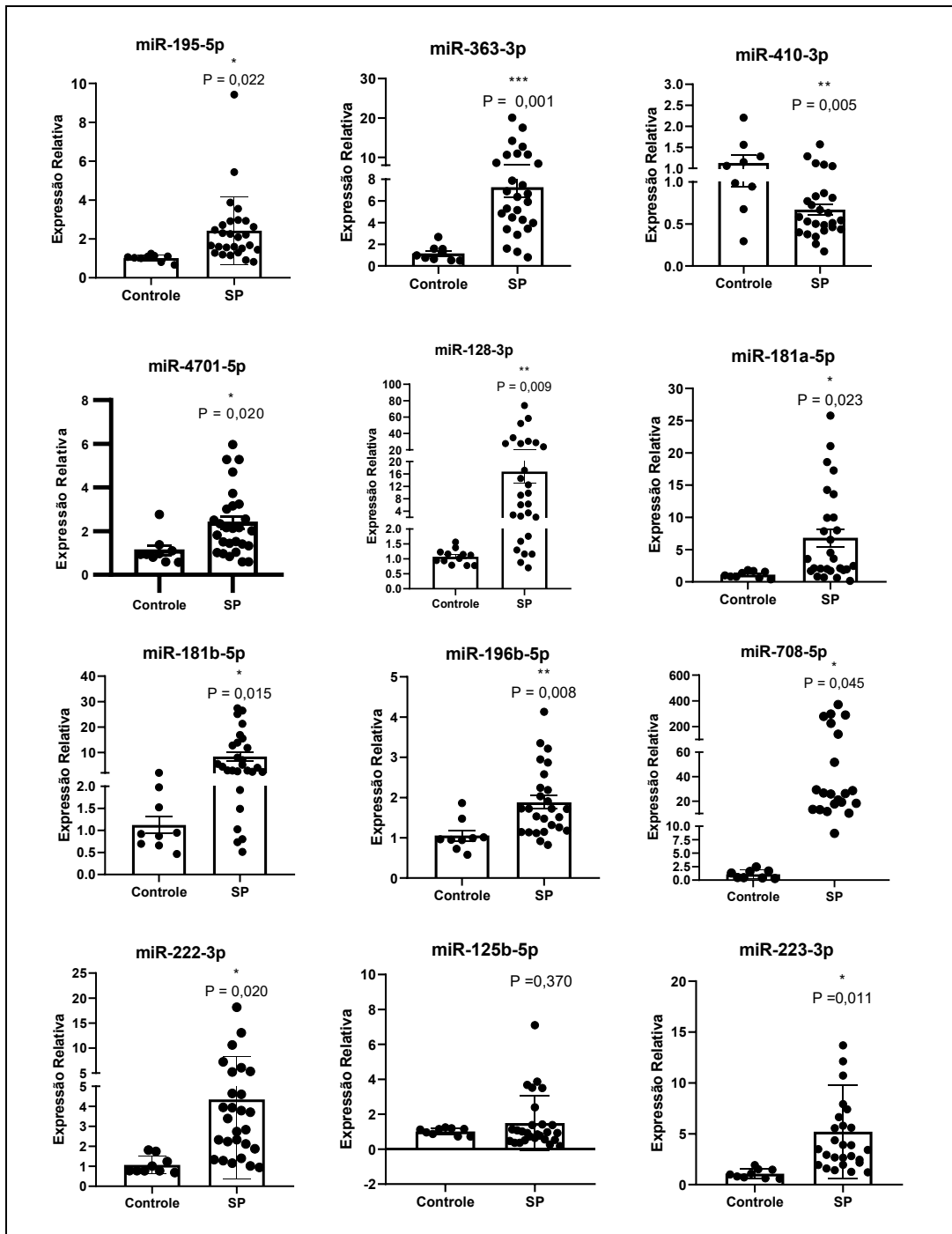
Tabela 5 – Valores de P comparando perfis de expressão de miRNAs entre amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes com LLA-B.

miRNA	Valor de P	Diferença significativa entre MO e SP
miR-152-3p	0,0169 *	Sim
miR-195-5p	0,7944	Não
miR-363-3p	0,3098	Não
miR-410-3p	0,3926	Não
miR-4701-5p	0,9949	Não
miR-128-3p	0,2222	Não
miR-181a-5p	0,2600	Não
miR-181b-5p	0,2912	Não
miR-196b-5p	0,6747	Não
miR-708-5p	0,3081	Não
miR-222-3p	0,4164	Não
miR-27a-3p	0,0116 *	Sim
miR-125b-5p	0,2208	Não
miR-223-3p	0,7043	Não

Nota: MO: medula óssea, SP: sangue periférico. Os asteriscos indicam os miRNAs que apresentaram diferença estatística (Teste-t não pareado; * $P<0,05$) no perfil de expressão dos miRNAs entre os grupos.

Comprovando-se a equivalência do perfil de expressão dos miRNAs entre os dois tipos de amostras, as etapas seguintes seguiram utilizando apenas amostras de sangue periférico. O perfil de expressão dos 12 miRNAs escolhidos foi avaliado em pacientes com LLA-B e comparado a indivíduos do grupo controle. Os resultados da análise de expressão relativa dos miRNAs comparando amostras de sangue periférico de pacientes com indivíduos controle ($P<0,05$) estão demonstrados na Figura 13 e resumidos na Tabela 6.

Figura 13 – Expressão relativa dos miRNAs em amostras de sangue periférico comparando amostras de pacientes com amostras controle.



Nota: SP: Sangue Periférico de pacientes. (Teste-t não pareado; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$)

Ao comparar as duas técnicas, os 4 miRNAs (miR-195-5p, miR-363-3p, miR-410-3p e miR-4701-5p) avaliados tanto pelo microarranjo quanto pela RT-qPCR (destacados em cinza na Tabela 6), apresentaram equivalência no status de expressão.

Tabela 6 - Perfis de expressão dos miRNAs.

miRNA	Valor de P	Status de Expressão RT-qPCR	Status de Expressão no Microarranjo	Status de Expressão segundo a Literatura
miR-195-5p	0,0215	<i>Up</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i> (DUYU et al., 2014)
miR-363-3p	0,0006	<i>Up</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i> * (MOSAKHANI et al., 2013; ZHANG et al., 2019) e <i>Down</i> ** (COSKUN et al., 2013)
miR-410-3p	0,0050	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Up</i> *** (QI et al., 2018)
miR-4701-5p	0,0200	<i>Up</i>	<i>Up</i>	ND
miR-128-3p	0,0094	<i>Up</i>		<i>Up</i> (DE OLIVEIRA et al., 2012)
miR-181a-5p	0,0231	<i>Up</i>		<i>Up</i> (DUYU et al., 2014)
miR-181b-5p	0,0154	<i>Up</i>		<i>Up</i> (DE OLIVEIRA et al., 2012)
miR-196b-5p	0,0083	<i>Up</i>		<i>Up</i> (POPOVIC et al., 2009; SCHOTTE et al., 2009b) e <i>Down</i> (DE OLIVEIRA et al., 2012)
miR-708-5p	0,0450	<i>Up</i>		<i>Up</i> (SCHOTTE et al., 2011a)(DE OLIVEIRA et al., 2015)
miR-222-3p	0,0197	<i>Up</i>		<i>Up</i> (JU et al., 2009b)
miR-125b-5p	0,3701	N		<i>Up</i> (SHAHAM et al., 2012)
miR-223-3p	0,0114	<i>Up</i>		<i>Up</i> *** (ZHU et al., 2012)

Nota: miRNAs em linhas sombreadas apresentaram-se diferencialmente expressos no microarranjo. N: Não houve diferença significativa, considerando $P < 0,05$. *Up*: miRNAs com expressão aumentada e *Down*: com expressão diminuída. * Regulados positivamente e ** Regulados negativamente em outros tipos de câncer, diferentes de LLA-B (LMA e LLA-T precursora respectivamente), *** Regulados positivamente em pacientes com LLA não especificada. ND: Não descrito na literatura associado a LLA-B.

Pela técnica de RT-qPCR o miR-125b-5p não apresentou diferença significativa nos perfis de expressão entre amostras de pacientes e de indivíduos controle e por esta razão não será considerado nas etapas seguintes deste trabalho. Um miRNA apresentou-se *Downregulated* (miR-410-3p) e os demais *Upregulated*. Dos 12 miRNAs avaliados, 8 apresentaram status de expressão semelhantes aos dados da literatura (miR-195-5p, miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p e miR-223-3p). Duyu e colaboradores (2014) demonstraram que os miR-708-5p, miR-195-5p e miR-181b-5p apresentaram-se *Upregulated* em amostras de LLA-B infantil, mostrando-se em acordo com os achados deste trabalho. Neste mesmo estudo, após 6 meses de tratamento quimioterápico, o perfil de expressão destes miRNAs foi novamente avaliado e demonstrou redução significativa (DUYU et al., 2014). Segundo De Oliveira e colaboradores (2015), o miR-708-5p também apresentou-se *Upregulated* em pacientes com LLA Pré-B infantil quando comparado a amostras de medula óssea do grupo controle (DE OLIVEIRA et al., 2015). Ao comparar LLA-B com LLA-T, Krzanowski e colaboradores (2017) verificaram que o miR-708-5p apresentou-se *Upregulated* em pacientes com LLA-B (KRZANOWSKI et al., 2017). Schotte e

colaboradores (2009) verificaram a expressão aumentada de miR-708 na LLA do tipo “B-other” (LLA-B negativa para as alterações no gene *MLL*, *TEL-AML1*, *BCR-ABL*, *E2A-PBX* e Hiperdiploidia), comparada a LLA com rearranjo no gene *MLL*. (SCHOTTE et al., 2009a). A maioria dos estudos demonstram uma regulação positiva do miR-708-5p, reforçando seu papel oncogênico nas LLAs, entretanto os mecanismos relacionados a sobrevida dos pacientes e a possibilidade de recidiva devem ser melhor estudados (MONTELEONE; LUTZ, 2017).

Duyu e colaboradores (2014) avaliaram o perfil de expressão de miRNAs em um grupo de pacientes majoritariamente com LLA infantil de células B e verificou que o miR-195-5p apresentou-se *Upregulated* tanto na avaliação por microarrnjo quanto nos estudos de validação pela técnica de qRT-PCR. O miR-195-5p apresenta um impacto significativo em várias neoplasias. Através da interação com mRNAs de genes importantes presentes em vias de sinalização, ele pode atuar como oncogene ou como supressor tumoral (YU et al., 2018). Alguns destes mRNAs alvo incluem *WEE1*, *CDK6* e *Bcl-2*. O miR-195-5p tem sido demonstrado como um regulador chave na proliferação, ciclo celular e apoptose (HE et al., 2011; YU et al., 2018).

Zhang e colaboradores (2009) verificaram que o miR-128, juntamente com miR-181a-5p apresentou-se superexpresso em amostras de pacientes com LLA, comparado a indivíduos sem a doença (ZHANG et al., 2009b). Este mesmo autor em um outro estudo também verificou a expressão aumentada de miR-128-3p em amostras de medula óssea de pacientes infantis com LLA-B, comparadas a amostras controle (ZHANG et al., 2009a). Em outro estudo, avaliando um grupo de pacientes com LLA majoritariamente de células B, o miR-128-3p e o miR-181b mostraram-se *Upregulated* quando comparados a amostras de medula óssea de crianças sem doenças hematológicas (DE OLIVEIRA et al., 2012). Nemes e colaboradores (2015) observaram que a expressão relativa do miR-128-3p foi significativamente mais alta em pacientes com LLA-B apresentando bom prognóstico, comparada aos pacientes de mau prognóstico (NEMES et al., 2015). Na LLA-T, Mets e colaboradores (2014) verificaram um papel oncogênico para o miR-128-3p, ao regular negativamente o gene supressor tumoral *PHF6* (METS et al., 2014). Além disso, Palumbo e colaboradores (2013) sugeriram um papel importante para o miR-128 na regulação da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR através da regulação negativa de *PTEN*, um importante supressor tumoral (PALUMBO et al., 2013).

Os miR-181a-5p e miR-181b-5p são membros da mesma família miR-181, e estão a uma localização de aproximadamente 200 nucleotídeos de distância um do outro, mais especificamente no cromossomo 9q33.3. Estes miRNAs são co-expressos e apresentam perfis semelhantes na LLA pediátrica. Os miR-181a-5p e miR-181b-5p apresentaram-se *Upregulated*,

em amostras de medula óssea ou sangue periférico tanto de pacientes com LLA-B com rearranjo do gene *MLL*, quanto em pacientes com LLA do tipo *B-other* (amostras negativas para todos os subtipos genéticos conhecidos em ALL), comparados a amostras controle (SCHOTTE et al., 2009a).

Popovic, com a revisão de Schotte e colaboradores (2009) verificaram um aumento da expressão de miR-196b-5p em pacientes com LLA portadores de rearranjos no gene *MLL*, entretanto este aumento não foi observado em pacientes com outros subtipos de LLA-B infantil sem o rearranjo (POPOVIC et al., 2009; SCHOTTE et al., 2009a). Neste trabalho, não foi investigado a presença de rearranjos no gene *MLL*, o que poderia justificar a superexpressão do miR-196b-5p. A expressão aumentada do miR-196b-5p leva ao aumento da capacidade proliferativa, sobrevivência, assim como a um bloqueio parcial na diferenciação de células progenitoras da medula óssea (POPOVIC et al., 2009). Entretanto, Bhatia e colaboradores (2010) encontraram um perfil de expressão diferente dos achados deste trabalho, onde o miR-196b-5p foi encontrado *Downregulated* em pacientes com LLA de células B em comparação ao grupo controle. O autor observou ainda a capacidade do miR-196b-5p regular negativamente um de seus alvos, o gene *C-MYC*. Este gene é encontrado frequentemente superexpresso em diversos tipos de câncer, incluindo as LLAs de células B (BHATIA; KAUL; VARMA, 2010).

Em um estudo avaliando os miRNAs diferencialmente expressos entre LLA e LMA, Mi e colaboradores (2007) verificaram que o miR-128-3p foi significativamente superexpresso em amostras de medula óssea de pacientes com LLA. De modo contrário, os miR-222-3p e miR-223-3p apresentaram expressão reduzida, quando comparadas aos pacientes com LMA (MI et al., 2007). Apesar do miR-223-3p ser descrito na literatura como um marcador específico expresso em células da linhagem mielóide (ALLANTAZ et al., 2012; NEMES et al., 2014), neste trabalho ele apresentou-se *Upregulated*. Um estudo conduzido por Zhu e colaboradores (2012), também verificou a expressão aumentada de miR-223-3p em pacientes com LLA não especificada, comparada ao grupo controle. Entretanto, ao comparar amostras entre pacientes com LLA e LMA, verificou-se um aumento na expressão de miR-223 na leucemia mielóide aguda.

Alguns miRNAs como o miR-410-3p (ZHANG et al., 2016) e o miR-222-3p (LAWRIE, 2013) podem atuar tanto como oncogenes como genes supressores tumorais em diversos tipos de câncer, dependendo do seu perfil de expressão e do perfil de seus alvos.

Em relação ao miR-222-3p, Ju e colaboradores observaram a superexpressão deste miRNA em pacientes com leucemia linfoblástica aguda infantil de células B precursora (LLA-

pré-B) (JU et al., 2009b), corroborando com o perfil encontrado neste estudo. Em relação aos miR-363-3p e miR-4701-5p, não foram encontrados estudos evidenciando seu status de expressão em LLA-B, bem como sua função ou relação com a doença. Por serem descritos pela primeira vez em pacientes com LLA-B como diferencialmente expressos pela técnica de microarranjo e validados pela técnica de RT-qPCR, estes miRNAs devem ser mais bem estudados. Em relação ao miR-410-3p, Qi e colaboradores (2018) encontraram resultados diferentes dos resultados deste trabalho. Utilizando a técnica de RT-qPCR e o gene U6 como controle interno, os autores verificaram que o miR-410-3p apresentou-se *Upregulated* em amostras de medula óssea de pacientes com LLA infantil não especificada, quando comparado a pacientes controle (Qi et al., 2018), enquanto que em nosso estudo, este mesmo miRNA apresentou-se *Downregulated*, tanto no microarranjo, quanto na validação por qRT-PCR. Esta divergência encontrada entre os nossos resultados e os da literatura pode ser devido ao uso de genes normalizadores diferentes, visto que a aplicação de diferentes estratégias de normalização têm impacto significativo nos perfis de expressão de miRNA da população de estudo (MASÈ et al., 2017).

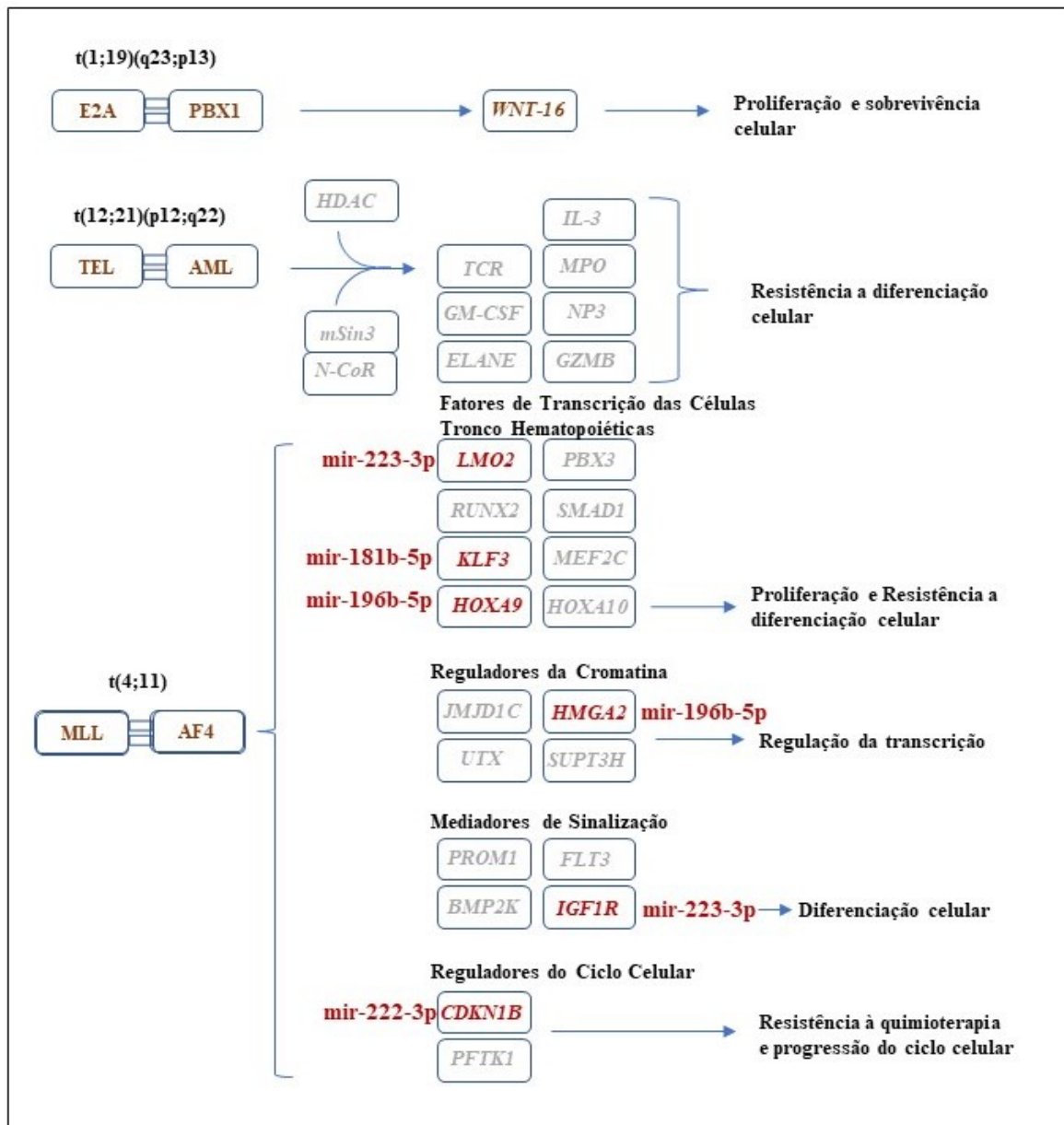
3.7.1 Vias Metabólicas:

Os miRNAs: miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p e miR-223-3p, descritos previamente na literatura associados a LLA e diferencialmente expressos nos pacientes, foram submetidos a análise de enriquecimento das vias KEGG para a verificação de possíveis vias metabólicas associadas ao desenvolvimento da LLA.

Das 49 vias enriquecidas resultantes, foram encontradas as vias relacionadas a diversos tipos de câncer como por exemplo o câncer de próstata, de endométrio, carcinoma de rim, câncer de tireoide, de pâncreas, de bexiga, de pulmão, câncer colorretal, melanoma, LMA e LMC. Outra via enriquecida em destaque é a via de transcrição desregulada no câncer (hsa05202). Esta via apresenta 52 genes e 6 miRNAs envolvidos em diversas neoplasias ($P = 6.846E^{-05}$). A Figura 13 apresenta os principais componentes desta via relacionados a LLA-B precursora. É possível observar que os genes *HMGA2*, *HOXA9*, *KLF3*, *CDKN1B*, *LMO2*, *IGF1R* e *WNT16* estão envolvidos resultam em proliferação e sobrevivência celular, resistência a diferenciação e resistência a quimioterapia (Figura 14). Em vermelho são destacados os miRNAs juntos de seus respectivos genes alvo. Nesta via as alterações observadas são relacionadas a rearranjos genéticos (*E2A-PBX1*, *TEL-AML* e *MLL-AF4*). Neste estudo, um dos

pacientes incluídos apresentou o rearranjo *E2A-PBX1*, entretanto o rearranjo *TEL-AML* não foi observado e o rearranjo *MLL-AF4* não foi avaliado.

Figura 14 - Via de transcrição desregulada no câncer associada a LLA-B precursora.



Um dos genes regulados pelo miR-196b-5p é o *HMG42*. A superexpressão de *HMG42* é comum na maioria das neoplasias e apresenta um papel importante na carcinogênese por atuar como regulador da transcrição (FUSCO; FEDELE, 2007; TALLINI; DAL CIN, 1999). O gene *HOXA9*, também regulado pelo miR-196b-5p, é um fator de transcrição com papel importante na proliferação das células-tronco hematopoéticas. *HOXA9* é comumente desregulado em leucemias agudas e sua superexpressão está fortemente correlacionada com mau prognóstico

(COLLINS; HESS, 2016). Devido a localização do miR-196b-5p humano, entre os loci de *HOXA9* e *HOXA10*, a co-expressão destes dois genes já verificada em LLA, sugere que ambos possam ser co-regulados (LI et al., 2012; SCHOTTE et al., 2010).

O gene *KLF3*, regulado pelos miR-181a-5p e miR-181b-5p, controla a diferenciação e o desenvolvimento de diferentes linhagens de células sanguíneas e a disfunção na expressão deste gene está associada ao desenvolvimento prejudicado de linfócitos B. Zhang e colaboradores (2015) verificaram que o gene *KLF3* apresentou expressão reduzida em blastos de pacientes com LLA (ZHANG; DING; XIONG, 2015).

O gene *CDKN1B*, regulado pelo miR-222-3p, tem como principal função o controle negativo da progressão do ciclo celular, prevenindo a progressão da fase G1 para a fase S em vários tipos de câncer (KOFF, 2006). Ele atua como um supressor tumoral, e sua expressão é frequentemente interrompida em cânceres humanos. Sun e colaboradores (2013) verificaram que a regulação positiva miR-222-3p, capaz de induzir um aumento na proliferação de células cancerígenas de ovário, possivelmente levou a regulação negativa de seu alvo *CDKN1B* (SUN et al., 2013).

O gene *LMO2*, um dos alvos do miR-223-3p, é um regulador transcricional com papel importante na hematopoiese, cuja regulação alterada frequentemente contribui para o desenvolvimento da leucemia, inclusive da LLA-B (EL OMARI et al., 2011). Malumbres e colaboradores (2011) sugeriram que a expressão de *LMO2* reflete o estágio de desenvolvimento no qual os blastos são interrompidos e que a expressão de *LMO2* se correlaciona com a sobrevida de pacientes com LLA-B, sendo um fator prognóstico independente (MALUMBRES et al., 2011).

O gene *IGF1R* também é um alvo regulado pelo miR-223-3p e codifica o receptor de membrana IGF-1R. A sinalização de IGF-1R envolve auto-fosforilação e subsequente fosforilação de proteínas associadas a múltiplas vias de sinalização, incluindo PI3K, Akt e MAPK. A ativação dessas vias de sinalização induz a diferentes respostas biológicas, incluindo crescimento, diferenciação, migração e sobrevivência celular (DELAFONTAINE; SONG; LI, 2004). Em um estudo conduzido por Whelan e colaboradores (2008) utilizando linhagem celular de LLA de células B (linhagem BLIN-2) foi verificado que a superexpressão de *HOXA9* induziu a expressão e ativação de *IGF-1R* e, subsequentemente, promoveu o crescimento de células leucêmicas (WHELAN; LUDWIG; BERTRAND, 2008).

Além da via de transcrição desregulada no câncer, outras vias discutidas anteriormente se destacaram, como a via das proteoglicanas no câncer, a via de sinalização Hippo, as vias relacionadas a ciclo celular e de sinalização da p53.

As vias relacionadas aos miRNAs avaliados mostram a importância dos miRNAs como biomarcadores em diversos tipos de câncer, incluindo a LLA-B. Estudos relacionados a função destes miRNAs diferencialmente expressos são necessários para ajudar na compreensão dos mecanismos moleculares específicos envolvidos na biogênese e progressão da LLA-B. Apesar do entendimento funcional dos miRNAs ainda encontrar-se nos estágios iniciais, o potencial destas moléculas no câncer é promissor. O seguimento e ampliação destes estudos para melhor descrever a função dos miRNAs nos mecanismos celulares tumorais poderá auxiliar na busca por métodos de diagnóstico complementares e contribuir cada vez mais com a qualidade de vida dos pacientes.

4 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Com base nos principais resultados listados abaixo:

- Foi encontrado um perfil de expressão de miRNAs sem diferença estatística comparando amostras de medula óssea e de sangue periférico de pacientes com LLA-B através da técnica de microarranjo e pela técnica de RT-qPCR. Doze dos quatorze miRNAs apresentaram perfis de expressão equivalentes entre os dois tipos de amostras;
 - Foram identificados 13 miRNAs diferencialmente expressos em amostras de sangue periférico entre pacientes com LLA-B e indivíduos do grupo controle;
 - Os quatro miRNAs validados pela técnica de RT-qPCR (miR-195-5p, miR-363-3p, miR-410-3p e miR-4701-5p) apresentaram equivalência no status de expressão entre as duas técnicas;
 - Dos 12 miRNAs avaliados por RT-qPCR, 8 apresentaram resultados semelhantes à literatura;
 - Os miRNAs: miR-363-3p, miR-381-3p, miR-409-3p, miR-4701-5p foram descritos pela primeira vez associados a LLA-B;
 - Os miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo apresentaram relação com vias metabólicas importantes na biogênese do câncer;
 - Os genes *CDKN1A*, *MDM2*, *CCND1*, 2 e 3, *SMAD2* e *MYC*, regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo, apresentam funções regulatórias da progressão do ciclo celular, proliferação e diferenciação celular;
 - Os miRNAs: miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-196b-5p, miR-708-5p, miR-222-3p e miR-223-3p apresentam vias enriquecidas relacionadas ao desenvolvimento do câncer, incluindo vias associadas a LLA-B;
 - Os genes *HMGA2*, *HOXA9*, *KLF3*, *CDKN1B*, *LMO2*, *IGF1R* e *WNT16* estão envolvidos na via de transcrição desregulada no câncer associada a LLA-B precursora e resultam em proliferação e sobrevivência celular, resistência a diferenciação e resistência a quimioterapia;
- por fim, é possível concluir que existe equivalência entre amostras de medula óssea e de sangue periférico em relação ao perfil de expressão de miRNAs com papéis importantes na LLA-B. Desta forma, a simples coleta de amostra do sangue periférico poderia refletir o perfil de

expressão da medula óssea. É possível concluir ainda que o perfil de expressão alterado de apenas um miRNA, até o momento, não é suficiente para caracterizar um subtipo de LLA-B, visto que esta neoplasia é caracterizada por grande variabilidade genética e que na literatura muitos miRNAs são descritos com perfis de expressão diferentes. Entretanto, mesmo com a necessidade de mais estudos ampliando o número de pacientes avaliados, alguns miRNAs podem ser possíveis candidatos a biomarcadores para diagnóstico da LLA-B, pois além de apresentarem perfis de expressão alterados neste e em outros relatos na literatura, eles possuem papel regulatório importante em vias metabólicas relacionadas a diferenciação, proliferação celular e apoptose.

REFERÊNCIAS

- ALARCON-VARGAS, D.; RONAI, Z. p53-Mdm2-the affair that never ends. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 4, 2002.
- ALLANTAZ, F. et al. Expression profiling of human immune cell subsets identifies miRNA-mRNA regulatory relationships correlated with cell type specific expression. **PLoS ONE**, 2012.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, 2004.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, 2016.
- BHATIA, S.; KAUL, D.; VARMA, N. Potential tumor suppressive function of miR-196b in B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 340, n. 1–2, p. 97–106, 2010.
- CABRAL, S. N. S. et al. Linha de base da leucemia linfocítica aguda para a vigilância da saúde ambiental no território de abrangência da refinaria de petróleo do Estado de Pernambuco, Brasil, 2004 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 601–608, 2012.
- CAMMAERTS, S. et al. Genetic variants in microRNA genes: Impact on microRNA expression, function, and disease. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. MAY, p. 1–12, 2015.
- COCCÉ, M. C. et al. Cytogenetic and Molecular Findings in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Experience of a Single Institution in Argentina. **Molecular Syndromology**, 2015.
- COLLINS, C. T.; HESS, J. L. Role of HOXA9 in leukemia: Dysregulation, cofactors and essential targets. **Oncogene**, 2016.
- COSKUN, E. et al. MicroRNA profiling reveals aberrant microRNA expression in adult ETP-ALL and functional studies implicate a role for miR-222 in acute leukemia. **Leukemia Research**, 2013.
- CURY, A. **Treinando a emoção para ser feliz**. [s.l.] Academia de Inteligência, 2001.
- DAWIDOWSKA, M. et al. Comprehensive Investigation of miRNome Identifies Novel Candidate miRNA-mRNA Interactions Implicated in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Neoplasia**, 2019.
- DE OLIVEIRA, J. C. et al. Differential MiRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. **Leukemia Research**, v. 36, n. 3, p. 293–298, 2012.
- DE OLIVEIRA, J. C. et al. MiR-708-5p is differentially expressed in childhood acute lymphoblastic leukemia but not strongly associated to clinical features. **Pediatric Blood and**

Cancer, p. 177–178, 2015.

DELAFONTAINE, P.; SONG, Y. H.; LI, Y. Expression, Regulation, and Function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in Blood Vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2004.

DESSEN P, H. J. . +8 or trisomy 8. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**, v. 13, n. 1, 2009.

DÍAZ-BEYÁ, M. et al. MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. **Leukemia**, 2014.

DO AMARAL, A. E. et al. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. **Pharmacological Research**, 2018.

DOULATOV, S. et al. Hematopoiesis: A human perspective. **Cell Stem Cell**, 2012.

DUYU, M. et al. Prospective evaluation of whole genome microrna expression profiling in childhood acute lymphoblastic leukemia. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

EL OMARI, K. et al. Structure of the leukemia oncogene LMO2: Implications for the assembly of a hematopoietic transcription factor complex. **Blood**, 2011.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira De Cancerologia**, 2006.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. DE. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas - In vitro diagnosis of acute lymphoid leukemias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 2, p. 91–8, 2004.

FERLAY, J. et al. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, 2009.

FUSCO, A.; FEDELE, M. Roles of HMGA proteins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, 2007.

GARTEL, A. L.; RADHAKRISHNAN, S. K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. **Cancer Research**, 2005.

GIROLAMI, I. et al. The activation status of the TGF- β transducer Smad2 is associated with a reduced survival in gastrointestinal cancers: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

GROBBELAAR, C.; FORD, A. M. The Role of MicroRNA in Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia: Challenges for Diagnosis and Therapy. **Journal of Oncology**, 2019.

GUPTA, S. et al. Treating Childhood Cancer in Low- and Middle-Income Countries. In: **Cancer**. [s.l: s.n.]. p. 121–146.

- HE, J. F. et al. Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 2011.
- HUTTER, S. et al. Modeling and targeting MYC genes in childhood brain tumors. **Genes**, 2017.
- INCA. **Estimativa 2020**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/cancer-infantojuvenil>>. Acesso em: 9 jul. 2020.
- IORIO, M. V.; CROCE, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO Molecular Medicine**, 2012.
- JIANG, X. et al. miR-495 is a tumor-suppressor microRNA down-regulated in MLL-rearranged leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2012.
- JONG KYONG, K. I. M.; ALAN DIEHL, J. Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. **Journal of Cellular Physiology**, 2009.
- JU, X. et al. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Hematology and Oncology**, 2009a.
- JU, X. et al. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric hematology and oncology**, v. 26, n. 1, p. 1–10, 2009b.
- KARAGKOUNI, D. et al. DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. **Nucleic Acids Research**, 2018.
- KOFF, A. How to decrease p27Kip1 levels during tumor development. **Cancer Cell**, 2006.
- KOTAKI, R. et al. MiRNAs in normal and malignant hematopoiesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.
- KRZANOWSKI, J. et al. Selected miRNA levels are associated with IKZF1 microdeletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Oncology Letters**, 2017.
- LAWRIE, C. H. MicroRNAs in hematological malignancies. **Blood Reviews**, 2013.
- LI, Z. et al. MiR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. **Nature Communications**, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 2001.
- LUAN, C.; YANG, Z.; CHEN, B. The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: Relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 2903–2914, 2015.
- LUNA-AGUIRRE, C. M. et al. Circulating microRNA expression profile in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Biomarkers**, 2015.

MALUMBRES, R. et al. LMO2 expression reflects the different stages of blast maturation and genetic features in B-cell acute lymphoblastic leukemia and predicts clinical outcome. **Haematologica**, 2011.

MASÈ, M. et al. Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation. **Scientific Reports**, 2017.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human molecular genetics**, v. 15 Spec No, n. 1, p. 17–29, 2006.

METS, E. et al. MicroRNA-128-3p is a novel oncomiR targeting PHF6 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, p. 1326–1333, 2014.

MI, S. et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19971–19976, 2007.

MONTELEONE, N. J.; LUTZ, C. S. miR-708-5p: A microRNA with emerging roles in cancer. **Oncotarget**, 2017.

MOSAKHANI, N. et al. MicroRNA profiling in chemoresistant and chemosensitive acute myeloid leukemia. **Cytogenetic and Genome Research**, 2013.

NEMES, K. et al. Expression of Certain Leukemia/Lymphoma Related microRNAs and its Correlation with Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pathology and Oncology Research**, v. 21, n. 3, p. 597–604, 2014.

NEMES, K. et al. Expression of Certain Leukemia/Lymphoma Related microRNAs and its Correlation with Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pathology & Oncology Research**, v. 21, n. 3, p. 597–604, jul. 2015.

OLIVEIRA, T. M. D. S. PCR em tempo real: métodos e aplicações. **Universidade de Aveiro**, 2010.

ORTEGA, S.; MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, 2002.

PALUMBO, T. et al. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTEN-AKT pathway. **Oncogene**, 2013.

PEREZ-ANDREU, V. et al. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. **Nature Genetics**, 2013.

POPOVIC, R. et al. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. **Blood**, p. 3314–3322, 2009.

QI, H. X. et al. MiR-410 regulates malignant biological behavior of pediatric acute lymphoblastic leukemia through targeting FKBP5 and Akt signaling pathway. **European**

Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, 2003.

RAMANI, R. et al. Integrative analysis of microRNA-mediated gene signatures and pathways modulating white blood cell count in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Biomarker Insights**, 2017.

RASHED, W. M. et al. MicroRNA as a diagnostic biomarker in childhood acute lymphoblastic leukemia; systematic review, meta-analysis and recommendations. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 136, p. 70–78, 2019.

REIS, R. D. S. et al. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 33, n. 2, p. 83–93, 2016.

ROSENFELD, R. Hemograma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2012.

SANJUAN-PLA, A. et al. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 126, n. 25, p. 2676–2685, 2015.

SCHOTTE, D. et al. Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 23, n. 2, p. 313–322, 2009a.

SCHOTTE, D. et al. Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, 2009b.

SCHOTTE, D. et al. Expression of miR-196b is not exclusively MLL-driven but is especially linked to activation of HOXA genes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, p. 1675–1682, 2010.

SCHOTTE, D. et al. Discovery of new microRNAs by small RNAome deep sequencing in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 25, n. 9, p. 1389–1399, 2011a.

SCHOTTE, D. et al. MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 96, n. 5, p. 703–711, 2011b.

SHAHAM, L. et al. MiR-125 in normal and malignant hematopoiesis. **Leukemia**, 2012.

SILVA, D. B. DA; SILVA, M. L. **Registro Hospitalar de Câncer do Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis -Santa Catarina - 2014 a 2018**. Florianópolis: [s.n.].

SILVEIRA, N. A. DA; ARRAES, S. M. A. A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arq Mudi**, v. 12, n. 1, p. 5–14, 2008.

STELIAROVA-FOUCHER, E. et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. **The Lancet Oncology**, 2017.

STILLER, C. **Incidence of Childhood Leukaemia** European Environment and Health

Information System, , 2009. Disponível em: <http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/97016/4.1.-Incidence-of-childhood-leukaemia-EDITED_layouted.pdf>

STUMPEL, D. J. P. M. et al. Hypermethylation of specific microRNA genes in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia: Major matters at a micro scale. **Leukemia**, 2011.

SUN, C. et al. miR-222 is upregulated in epithelial ovarian cancer and promotes cell proliferation by downregulating P27kip1. **Oncology Letters**, 2013.

SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, n. 20, p. blood-2016-01-643569, 2016.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France.** Revised 4th ed. Lyon: IARC, 2017.

TALLINI, G.; DAL CIN, P. HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: A common occurrence in human tumors. **Advances in Anatomic Pathology**, 1999.

TOMIZAWA, D. Recent Progress in the Treatment of Infant Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society**, 2015.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. **Science**, 2007.

VITALE, D. Comparing the Agilent 2100 Bioanalyzer Performance to Traditional DNA Analysis Techniques. **Agilent Technologies**, 2016.

VLACHOS, I. S. et al. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Research**, 2015.

WEINKAUFF, R. et al. Use of peripheral blood blasts vs bone marrow blasts for diagnosis of acute leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, 1999.

WHELAN, J. T.; LUDWIG, D. L.; BERTRAND, F. E. HoxA9 induces insulin-like growth factor-1 receptor expression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, 2008.

XUE, Y. et al. CCND1 G870A polymorphism is associated with toxicity of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, 2015.

YU, W. et al. MicroRNA-195: A review of its role in cancers. **OncoTargets and Therapy**, 2018.

ZANETTE, D. L. et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 11, p. 1435–1440, nov. 2007.

ZHANG, H. et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS

relapse prediction in pediatric acute leukemia. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7826, 2009a.

ZHANG, H. et al. Genome-Wide Analysis of Small RNA and Novel MicroRNA Discovery in Human Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Extensive Sequencing Approach. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e6849, 2 set. 2009b.

ZHANG, H. et al. High expression of miR-363 predicts poor prognosis and guides treatment selection in acute myeloid leukemia. **Journal of Translational Medicine**, 2019.

ZHANG, P. et al. Clinical significance of dysregulation of miR-381 in pediatric acute myeloid leukemia. **European Journal of Medical Research**, v. 25, n. 1, p. 42, 16 dez. 2020.

ZHANG, Q.; DING, N.; XIONG, Q. Regulatory Roles of KLF3 in Hematopoiesis of K562 Leukemia Cells. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, 2015.

ZHANG, Y. F. et al. miR-410-3p suppresses breast cancer progression by targeting Snail. **Oncology Reports**, 2016.

ZHU, Y. D. et al. Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. **Medical Oncology**, p. 2323–2331, 2012.

ZIINO, O. et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with associated genetic conditions other than Down's syndrome. The AIEOP experience. **Haematologica**, v. 91, n. 1, p. 139–140, 2006.

APÊNDICE A

Valores de integridade do RNA total (RIN) e concentração [C] em ng/ μ L.

	Amostra	RIN	[C] ng/uL		Amostra	RIN	[C] ng/uL		Amostra	RIN	[C] ng/uL
	Pacientes com amostras de medula óssea e sangue periférico	01MO	6.70		116.8	Pacientes com amostras de sangue periférico	12SP		2,70	7,7	Controles
01SP		3.50	13.1	13SP	2.70		51.2	C2	*	51,6	
02MO		2.60	33.2	14SP	3.60		77.6	C3	*	24,4	
02SP		2.60	14.4	15SP	2.90		62.0	C4	*	49,2	
03MO		2.40	68.0	16SP	2.80		22.4	C5	*	37,2	
03SP		2.80	25.2	17SP	4.40		90.4	C6	*	33,6	
04MO		2.30	156.0	18SP	2,80		56,8	C7	*	26	
04SP		2.40	48.8	19SP	3,70		7,1	C8	*	32	
05MO		7.70	52.8	20SP	1,50		30,8	C9	*	28	
05SP		7.20	56.0	21SP	*		25,2				
06MO		3.60	53.2	22SP	2,50		26,8				
06SP		3.20	34.0	23SP	2,70		51,6				
07MO		4.40	208.0	24SP	2,50		47,2				
07SP		4.90	35.6	25SP	*		42				
08MO		6.20	121.2	26SP	*		39,2				
08SP		4.50	85.2	27SP	*		57,2				
09MO		3,70	11,5								
09SP		7,10	10,2								
10MO	2,60	88,4									
10SP	6,40	42,4									
11MO	2,80	83,6									
11SP	N/A	50,4									

Nota: MO: Medula Óssea; SP: Sangue periférico; RIN: Integridade do RNA (do inglês *RNA integrity number*); * amostras as quais não foi possível avaliar o RIN.

APÊNDICE B

Artigo de revisão publicado em 2020 na **TRENDS IN CANCER RESEARCH**, Volume 15.

Regulatory mechanisms of microRNAs in childhood acute lymphoblastic leukemia

Tania S. De Liz¹, Michele Rode¹, Tânia B. Crezynski-Pasa¹

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil. E-mail: tania.pasa@ufsc.br

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer, occurring mainly in children three to five years of age. ALL is a complex disease that involves both B-lineage and T-lineage precursor cells. Several studies have shown that microRNAs (miRNAs) can be used as a new class of biomarkers for ALL. These small, single-stranded, non-coding RNA molecules regulate gene expression through direct interaction with specific messenger RNAs. This review aims to summarize data from studies on miRNA and childhood ALL and presents the results of a gene ontology enrichment analysis performed on gene sets regulated by miRNAs. Most studies reported that different miRNAs are involved in childhood ALL; miR-196b-5p, miR-128-3p, miR-223-3p, miR-181a-5p, miR-27a-3p, and miR-708-5p were the most frequent. These miRNAs regulate genes and biological functions related to hematopoiesis, cell death, and proliferation. Although some miRNAs are promising biomarkers for ALL diagnosis, their use in clinical practice is still a challenge. This review reveals the need for further investigations on the role of miRNAs in disease development, diagnosis, and prognosis.

Keywords: biomarkers, hematopoiesis, cell death, cell proliferation, apoptosis, microRNA.

APÊNDICE C**Artigo sobre relato de caso publicado em 2020 na GENE REPORTS****Differential microRNA expression in childhood B-ALL with trisomy 8: A case report**

Tania S. De Liz ^a, Ana Paula Freund Winneschhofer ^b, Amanda Ibagy ^b, Iara Fabricia Kretzer ^c, Michele P. Rode ^a, Tania B. Creczynski-Pasa ^a

a - Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

b - Department of Pediatric Oncohematology, Joana de Gusmao Children's Hospital, Florianópolis, SC 88025-301, Brazil

c - Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

Abstract

B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia account for approximately 80% of leukemia cases in children and adolescents. Numerical chromosomal changes are important prognostic factors. Trisomy 8 is one of the most frequent numerical aberrations in acute myeloid leukemia but is rarely found in lymphoid malignancies. Here, we share our findings in a childhood acute lymphoblastic leukemia patient with trisomy 8, referred for diagnostic assessment. Physical examination, myelogram, complete blood count, cytogenetic, and RT-PCR analysis for TELAML1 and E2A-PBX1 rearrangements were carried out. Microarray methodology was used to assess the miRNA expression profile. We highlight 36 miRNAs differentially expressed ($p < 0.001$, fold change >2.0) comparing with mononuclear cells from five subjects without leukemia. Among the miRNAs differentially expressed in our patient, only two have been described in B-ALL, namely miR-133b and miR-181b-5p. Some miRNAs which was downregulated in our patient as miR-495 and miR-127 have tumor suppressor function. None of the miRNAs located on chromosome 8 were significantly upregulated. The relationship between the altered miRNA expression profiles and leukemogenesis can be associated with global changes in gene expression and regulation patterns caused by acquired trisomy 8, influencing the patient's response to treatment and prognosis.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, Rare chromosomal abnormality, miRNA profile, Prognosis.

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de pesquisa: MicroRNA em Leucemias Infantis: Biomarcador para Diagnóstico e Prognóstico

Eu, Tania Souza de Liz, orientada pela professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa da Universidade Federal de Santa Catarina, estamos desenvolvendo este projeto junto com o Hospital Infantil Joana de Gusmão, para estudar as leucemias infantis e ajudar a melhorar o diagnóstico desta doença.

Você, como representante legal do seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar deste estudo na qualidade de voluntário. Você e seu filho (a) tem toda a liberdade em decidir se deseja participar ou não do mesmo. Não há nenhuma consequência negativa, caso você decida não participar. Caso vocês concordem em participar do estudo, necessitaremos da sua autorização para acessar o prontuário médico hospitalar e também para utilizar um pouco das amostras de medula óssea (sangue presente nos ossos) e de sangue periférico do seu filho (a), que já serão retiradas habitualmente para a realização de outros exames.

Além dos dados obtidos a partir das amostras de sangue e de medula de seu filho, também serão utilizados dados do prontuário, referentes a exames de diagnóstico realizados em paralelo por outros laboratórios como rotina. Através destes dados será possível avaliar a relação existente entre os nossos resultados e os resultados de outros exames. Através desta análise espera-se melhorar o diagnóstico e prognóstico da doença, além de se buscar em médio prazo uma relação entre o diagnóstico e um tratamento individualizado.

As coletas de sangue e de medula óssea serão realizadas por profissionais habilitados em ambiente adequado dentro do hospital e complicações por causa destes procedimentos são raras e de pequeno porte, mas existe a possibilidade de leve sensação de dor no local por causa do furo da agulha, bem como a formação de hematoma que desaparece em poucos dias. A coleta da medula óssea é feita por um médico especializado e em ambos os casos a equipe médica terá todos os cuidados para evitar qualquer desconforto para o paciente durante as coletas. Se isso acontecer, a equipe de coleta do hospital tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto.

Lembramos que a participação de seu filho (a) neste projeto pode beneficiar futuramente outras crianças com leucemia, tanto na descoberta da doença quanto no tratamento. Nenhum nome ou endereço será escrito nas amostras de sangue e medula óssea coletadas, ou seja, em nenhum momento os dados do seu filho (a) serão identificados. Em nenhum momento vocês terão despesas por causa deste estudo, mas também não irão ganhar dinheiro por ter participado dele.

As amostras de sangue e de medula óssea serão utilizadas apenas pelos pesquisadores envolvidos neste Projeto e serão processadas no laboratório GEIMM da Universidade Federal de Santa Catarina (endereço abaixo). Os dados e registros pessoais dos participantes serão mantidos em sigilo no Hospital Infantil Joana de Gusmão e somente os pesquisadores diretamente relacionados ao projeto e os médicos que acompanham o paciente terão acesso aos mesmos. Você será informado (a) dos resultados ao final da pesquisa. Além do mais, em qualquer momento e por qualquer circunstância você tem toda liberdade de entrar em contato com o coordenador do projeto para pedir informações adicionais ou mesmo pedir para sair estudo. Os resultados dessa pesquisa serão disponibilizados para domínio público por meio de revistas científicas e pela internet.

Não serão realizados procedimentos além dos combinados previamente com vocês, nem haverá nenhum risco resultante especificamente deste estudo. Além disso, o seu filho (a) terá acompanhamento médico durante e após a coleta das amostras de medula óssea e acompanhamento de um enfermeiro ou técnico em enfermagem durante a coleta de sangue, conforme a rotina do HIJG.

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:
Laboratório GEIMM, Campus Universitário, Rua Delfino Conti s/n, CCS, Bloco H, 4º andar, Trindade, Florianópolis – SC, (48) 3721-2212 ou ao Comitê de Ética Em Pesquisa Com Seres Humanos da UFSC que se encontra no Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400, e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br, Telefone: + 55 48 3721-6094

¹Via do paciente (1 de 2 páginas)

APRESENTAM-SE ABAIXO OS TERMOS DA DECLARAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO DESTE ESTUDO:

Eu _____ (nome), portador da CI _____ (n° e órgão emissor) _____, CPF _____, autorizo a utilização de amostras de sangue periférico e de medula óssea de meu filho (a) para o desenvolvimento de estudos referentes ao projeto de pesquisa "**MicroRNA em Leucemias Infantis: Biomarcador para Diagnóstico e Prognóstico**" a ser realizado na Universidade Federal de Santa Catarina com colaboração do Hospital Infantil Joana de Gusmão em Florianópolis nos termos descritos acima. Durante a entrevista, recebi informações sobre o estudo acima e me senti completamente esclarecido quanto aos objetivos do trabalho. Li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa, além disso entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que uma via deste documento ficará com o responsável pela pesquisa. Estou ciente de que a participação no projeto é voluntária e não acarreta ônus para mim e/ou minha família/tutelado legal. Sei ainda que em qualquer momento, posso pedir maiores esclarecimentos ao pesquisador responsável, bem como cancelar a participação sem que isso traga prejuízo ao meu tratamento.

_____	_____	____/____/____
Participante Vulnerável (Assentimento)	Representante legal	Data

O estudo será realizado na Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis – SC, especificamente no Laboratório GEIMM, Campus Universitário, Rua Delfino Conti s/n, CCS, Bloco H, 4º andar, Trindade, Florianópolis – SC, (48) 3721-2212, sob a coordenação da Prof. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, cujo endereço é Rodovia Haroldo Soares Glavan, 3522, casa 213, Condomínio Marina Del Rey, Cacupé, Florianópolis, SC, (48) 3733-5451 e 8406-6658, tania.pasa@ufsc.br. Os pesquisadores, abaixo assinados se comprometem com a privacidade das informações realizadas no âmbito da pesquisa e com o cumprimento das ações acima citadas.

Ainda, o Comitê de Ética Em Pesquisa Com Seres Humanos da UFSC encontra-se no Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400, e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br, Telefone: + 55 48 3721-6094.

Esta pesquisa está submetida a Resolução 466/12.

O que é o Comitê de Ética?

Um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o CEP do Hospital Infantil Joana de Gusmão pelo telefone 48 – 3251-9092 ou pelo email: cephijg@saude.sc.gov.br. Você pode inclusive fazer a reclamação sem se identificar, se preferir.

Aluna: Tania Souza de Liz (CPF 035.578.759-89)

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Pesquisadora Responsável pelo estudo
CPF 551695540-87

Data

¹ Via do paciente (2 de 2 páginas)