

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

**LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA:
AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS E
SUA RELAÇÃO COM O ESTADIAMENTO DA
DOENÇA**

Autora: Tatiane Vieira Braga
Orientador: Adriano de Paula Sabino
Coorientadora: Maria das Graças Carvalho

BELO HORIZONTE
Setembro
2017

TATIANE VIEIRA BRAGA

**LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA:
AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS E
SUA RELAÇÃO COM O ESTADIAMENTO DA
DOENÇA**

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

Orientador: Adriano de Paula Sabino
Coorientadora: Maria das Graças Carvalho

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG e ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pela oportunidade de realização deste curso de doutorado.

Ao professor Adriano de Paula Sabino, meu orientador, pela confiança e orientação durante toda esta caminhada.

A professora Maria das Graças Carvalho, minha coorientadora pela disponibilidade, dedicação e orientação durante este estudo.

Aos médicos Dr. Sergio Schusterschitz da Silva Araujo, Glaciano Nogueira Ribeiro pela imensa colaboração, compreensão e dedicação.

Aos pacientes e indivíduos do grupo controle que contribuíram voluntariamente com este estudo.

Aos colegas do laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo convívio e em especial à Fernanda Cristina Gontijo Evangelista e Marie Gabriele Santiago pela dedicação, incentivo e carinho.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na conquista de mais essa etapa da minha vida.

A minha família, pelo amor, paciência e incentivo em todos os momentos da minha vida. Em especial ao meu esposo Júlio por seu amor e dedicação.

A Deus por me conduzir e abençoar.

RESUMO

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma neoplasia de linfócito B. A evolução clínica é extremamente variável entre os indivíduos acometidos, com sobrevida que varia de alguns meses até muitos anos. Avaliar novos biomarcadores de prognóstico na LLC torna-se extremamente importante para a identificação precoce de indivíduos que apresentaram rápida progressão da doença e que podem se beneficiar de um protocolo de tratamento individualizado. Dentre esses biomarcadores, a avaliação dos microRNAs, Bcl-2, ZAP-70 e Ang-2 poderão contribuir para o entedimento do prognóstico dos pacientes com LLC. Neste estudo foram avaliados 43 pacientes com LLC, provenientes da Unidade de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e 15 indivíduos controles. Na avaliação da global de leucócitos, linfócitos, hemoglobina e plaquetas foram encontradas diferenças significativas quando comparados os pacientes e o grupo controle. Diferenças significativas na expressão de miR-15a ($p < 0.001$) e miR-16-1 ($p < 0.001$) e na concentração plasmática de Bcl-2 ($p < 0.001$) foram observadas quando comparados os pacientes e o grupo controle. Na expressão de Ang-2, foi observada diferença significativa na expressão de Ang-2 quando comparados os pacientes e controles. Em contraste, na avaliação da expressão de ZAP-70 não foi encontrada diferença significativa. Os dados analisados em conjunto sugerem que os marcadores miR-15a e miR-16-1, além de Bcl-2, estão associados ao desequilíbrio no processo de apoptose, fato que acarretaria acúmulo de linfócitos e agravamento da doença.

Palavras chave: Leucemia linfocítica crônica. Biomarcadores. miR-15a. miR-16-1.

ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), according to the World Health Organization (WHO) classification, is a B lymphocyte neoplasm. The clinical evolution is extremely variable among the individuals affected, with survival ranging from a few months to many years. Evaluating new prognostic biomarkers in CLL becomes extremely important for the early identification of individuals who have experienced rapid disease progression and who may benefit from an individualized treatment protocol. Among these biomarkers, evaluation of microRNAs, Bcl-2, ZAP-70 and Ang-2 may contribute to the prognosis of patients with CLL. In this study, 43 patients with CLL, from the Hematology and Oncology Unit of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais, and 15 control subjects were evaluated. In the overall evaluation of leukocytes, lymphocytes, hemoglobin and platelets, significant differences were found when comparing the patients and the control group. Significant differences in the expression of miR-15a ($p < 0.001$) and miR-16-1 ($p < 0.001$) and in plasma concentration of Bcl-2 ($p < 0.001$) were observed when comparing the patients and the control group. In Ang-2 expression, a significant difference in Ang-2 expression was observed when compared to patients and controls. In contrast, in the evaluation of ZAP-70 expression no significant difference was found. The data analyzed together suggest that the markers miR-15a and miR-16-1, in addition to Bcl-2, are associated with imbalance in the apoptosis process, which would lead to accumulation of lymphocytes and worsening of the disease.

Key Words: Chronic lymphocytic leukemia. Biomarkers. miR-15a. miR-16-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da biogênese de miRNA.	21
Figura 2 - Esquema da modulação de miR-15a e miR-16-1 na expressão de Bcl-2.	25
Figura 3 - Gel de agarose para avaliação do cDNA.	42
Figura 4 - Quantificação da expressão do endógeno RNU48 pela PCR em tempo real.	43
Figura 5 - Gráfico da curva padrão da dosagem plasmática de Bcl-2.	44
Figura 6 - Quantificação da expressão do endógeno GAPDH pela PCR em tempo real.	46
Figura 7 - Quantificação da expressão do endógeno GAPDH pela PCR em tempo real.	48
Figura 8 - Expressão de miR-15a no grupo Controle, Binet A (A) e Binet B+C (B+C).	54
Figura 9 - Expressão de miR-16-1 no grupo Controle, Binet A (A) e Binet B+C (B+C).	55
Figura 10 - Concentração de Bcl-2 no Controle, Binet A e Binet B+C.	56
Figura 11 - Expressão de ZAP-70 no grupo Controle, Binet A (A) e Binet B+C (B+C).	57
Figura 12 - Expressão de Ang-2 no grupo Controle, Binet A (A) e Binet B+C (B+C).	58
Figura 13 - Correlação entre miR-15a e Plaquetas.	59
Figura 14 - Correlação entre miR-15a e Linfócitos.	59
Figura 15 - Correlação entre miR-16-1 e Linfócitos.	60
Figura 16 - Correlação entre Bcl-2 e Leucócitos.	60
Figura 17 - Correlação entre ZAP-70 e Plaquetas.	61
Figura 18 - Avaliação da expressão de miR-15a em cultura de células de pacientes com LLC.	62
Figura 19 - Avaliação da expressão de miR-16- em cultura de células de pacientes com LLC.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios para diagnóstico de LLC.	17
Tabela 2 - Estadiamento de Binet e Rai.	18
Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na PCR em tempo real.	45
Tabela 4 - Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LLC e controle.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang - Angiopoietina

Ang-2 - Angiopoietina-2

Bcl-2 - B-cell lymphoma 2

bFGF - Fator de crescimento de fibroblastos básico

CD19 - glicoproteína de membrana 19

CD20 - glicoproteína de membrana 20

CD23 - glicoproteína de membrana 23

CD25 - glicoproteína de membrana 25

CD27 - glicoproteína de membrana 27

CD38 - glicoproteína de membrana 38

CD5 - glicoproteína de membrana 5

CD69 - glicoproteína de membrana 69

CD71 - glicoproteína de membrana 71

DGCR8 - do inglês Di George syndrome critical region gene 8

Exp5 - Exportina-5

IgVH - região variável do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas

LDT - tempo de duplicação de linfócitos

LLC - Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)

miR - miRNAs

miRNAs - micro-RNAs

MMP-9 - Metaloproteinase-9

OMS - Organização Mundial de Saúde

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

pri-miRNA - miRNA primário

RISC - do inglês RNA-induced silence complex

TCR - complexo do receptor de células T

TSP-1 - Trombospondina-1

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF - Fator de crescimento endotelial

ZAP-70 - proteína tirosino kinase de 70 kDa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Leucemia Linfocítica Crônica	15
2.2 Biogênese dos miRNAs	20
2.3 MiRNAs na Leucemia Linfocítica Crônica	22
2.4 MiR-15a, miR-16-1 e Bcl-2 na Leucemia Linfocítica Crônica	23
2.5 Angiogênese e Zap-70	27
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 Delineamento experimental	37
5.2 Casuística	38
4.2.1 Critérios de inclusão	39
4.2.3 Critérios de exclusão	39
5.3 Amostra biológica	39
5.4 Preparo do banco de dados	40
5.5 Métodos	41
5.5.1 Extração de RNA	41
5.5.2 Quantificação de RNA	41
5.5.3 Síntese do DNA complementar	41
5.5.4 Avaliação da expressão de miRNA	42
5.5.5 Avaliação da concentração plasmática de Bcl-2	44
5.5.6 Avaliação da expressão de ZAP-70	45
5.5.7 Avaliação da expressão de Ang-2	47
5.5.8 Avaliação da expressão de miR-15a e miR-16-1 in vitro após tratamento com fludarabina	49
5.5.8.1 Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	49
5.5.8.2 Avaliação da IC50 da fludarabina	49
5.5.8.3 Avaliação da expressão de miR-15a e miR-16-1	50
5.6 Análise dos dados	50
6. RESULTADOS	52

7. DISCUSSÃO	64
8. CONCLUSÃO	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
10. ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma neoplasia que tem como característica o acúmulo de linfócitos B no sangue, medula óssea e órgãos linfoides sólidos, acometendo principalmente homens com idade superior a 60 anos. Clinicamente os pacientes podem apresentar quadros indolentes, onde a doença permanece assintomática por anos ou quadros agressivos, com rápida evolução ao óbito. No momento do diagnóstico realiza-se a classificação pelos estadiamentos de Binet e Rai, que são fáceis de aplicar na prática clínica, mas não conseguem prever a evolução do paciente para a doença agressiva.

Para auxiliar na terapêutica dos pacientes com LLC, o uso de biomarcadores para a identificação precoce de indivíduos cuja doença pode evoluir rapidamente é de grande importância. Estes pacientes uma vez identificados, poderiam receber protocolos de tratamento mais agressivos e individualizados. Biomarcadores como miRNAs, Bcl-2, ZAP-70 e Ang-2 tem sido estudados e tem-se mostrado potenciais biomarcadores que poderão contribuir para a avaliação do prognóstico da doença.

A deleção 13q14, a mais frequente nos pacientes com LLC, está relacionada à redução dos miRNAs miR-15a e miR-16-1. Este quadro de menor expressão de miR-15a e miR-16-1 leva a maior expressão de Bcl-2 e consequentemente redução no processo de apoptose gerando acúmulo de linfócitos B, que é característica central da doença. Na patogênese da LLC, as células que se acumulam perdem sua funcionalidade, e isso pode ser evidenciado pela presença de ZAP-70 nos linfócitos B, sendo esta molécula uma proteína sinalizadora de linfócitos T. Na LLC a proteína Ang-2 é secretada pelas células leucêmicas e concentrações elevadas desta têm sido associadas com estágio avançado da doença e menor sobrevida dos pacientes.

A avaliação do papel dos miRNAs, Bcl-2, ZAP-70, e Ang-2 na patogênese de LLC poderá evidenciar a importância destes como marcadores de prognóstico. Alterações nestes parâmetros podem contribuir para a sobrevivência celular, proliferação e desenvolvimento da doença. Desta forma, foi conduzida uma análise de expressão gênica e níveis plasmáticos de fatores ligados à patogênese da LLC, em um grupo significativo de pacientes que foram encaminhados ao Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com diagnóstico confirmado de Leucemia Linfocítica Crônica, na tentativa de se obter

novos conhecimentos e bases científicas que possam contribuir para um maior entendimento da associação dos fatores prognósticos na LLC em nosso meio. Nosso estudo foi o começo para identificação de novos biomarcadores de prognóstico na LLC em nível local, valendo ressaltar que se um parâmetro for configurado como um biomarcador prognóstico outros fatores devem ser analisados como sensibilidade, especificidade, viabilidade e capacidade econômica. Após a identificação da ligação de um parâmetro com a gravidade da doença os estudos irão avançar no intuito da utilização clínica deste marcador buscando alcançar melhores resultados no tratamento do paciente.

Diante do exposto acima, a pergunta principal do presente estudo a ser respondida consiste na dúvida se os biomarcadores acima, particularmente os miRNAs, estão associados à redução do processo de apoptose, fato que acarretaria acúmulo de linfócitos e agravamento da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucemia Linfocítica Crônica

A leucemia é uma doença resultante da mutação em uma célula progenitora, cuja prole forma um clone de células leucêmicas. A célula na qual ocorre a transformação leucêmica pode ser uma precursora de células linfóides, uma precursora de células mielóides ou ainda uma célula-tronco pluripotente, com capacidade para diferenciar-se tanto em células mielóides quanto em células linfóides (SWERDLOW *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017).

De acordo com a classificação da OMS, a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma neoplasia de linhagem B caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no sangue, medula óssea e órgãos linfóides sólidos. Esses linfócitos apresentam grande longevidade e geralmente se desenvolvem devido à inibição do processo de apoptose (DIGHIERO, 2005; LORAND-METZE, 2005; SWERDLOW *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017).

A patogênese da LLC, caracterizada pela replicação clonal de uma célula B, está associada a defeitos intrínsecos e extrínsecos de seu mecanismo apoptótico que influenciam a atividade das células B no microambiente do tecido (GHOSH *et al.*, 2010). As características multipotente e auto-renovável das células-tronco hematológicas são provavelmente o principal evento no desenvolvimento de LLC, levando à geração de clones de células B (KIKUSHIGE *et al.*, 2011). A transformação maligna de células B também está relacionada a deleções cromossômicas que levam a uma menor expressão de miRNAs associados ao processo de controle da apoptose. Os miRNAs (micro-RNAs) 15a e 16-1 estão correlacionados com a leucemogênese, ao promoverem uma expressão aumentada de proteínas antiapoptóticas (KLEIN *et al.*, 2010).

A etiologia da LLC é desconhecida, embora uma maior prevalência seja encontrada nos idosos, com idade média de 64-70 anos, com incidência anual de 5.1 casos/100.000 pessoas, sendo mais frequente em países ocidentais do que em países orientais. Após o diagnóstico, mais de 70% dos pacientes têm 65 anos de idade ou mais. Esta leucemia é mais prevalente nos homens e está relacionada a fatores ambientais, como exposição a agentes químicos e derivados do petróleo. A apresentação clínica no diagnóstico é extremamente variável sendo aproximadamente 60% dos pacientes assintomáticos

(GONÇALVES *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2017; FURTADO *et al.*, 2017; ROWSWELL-TURNER *et al.*, 2017).

O diagnóstico é realizado através da combinação de informações sobre a condição clínica e os dados das células sanguíneas. Dados importantes no hemograma são linfocitose persistente, 70 a 90% de pequenos linfócitos, presença de manchas de Gumprecht (restos celulares), também sendo observado linfocitose >30% no mielograma, independente da presença ou não de linfonomegalia, hepato e/ou esplenomegalia, anemia e/ou plaquetopenia. A imunofenotipagem é essencial na avaliação diagnóstica e permite o diagnóstico diferencial de LLC e outras síndromes linfoproliferativas. Na análise da expressão dos marcadores de superfície celular utilizando o score de Matutes, através de um sistema de pontuações é possível realizar o diagnóstico de LLC. Um escore ≥ 4 é indicativo de LLC e uma pontuação de ≤ 3 deve levar em consideração outras síndromes linfoproliferativas. Neste sistema soma-se 1 ponto para CD5 positivo, CD23 positivo, CD 22 negativo/positivo, FMC7 negativo ou slg fraco e equivale a 0 pontos CD5 negativo, CD23 negativo, CD22 moderado ou forte e FMC7 negativo (MOREAU *et al.*, 1997; KÖHNKE *et al.*, 2017).

Cerca de 80% dos casos de LLC mostram alterações genômicas, sendo mais comuns a trissomia do 12 (16%), a deleção do 17p (7%), 11q (18%) e a deleção na região 14.3 do cromossomo 13 (supressão 13q14, 55%). Em resumo (Tabela 1), para realização do diagnóstico são avaliadas características morfológicas das células em sangue periférico e medula óssea, podendo ser necessários exames de imunofenotipagem e biologia molecular (GARICOCHEA, 2005; LORAND-METZE, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2009; KLEIN *et al.*, 2010; SAGATYS; ZHANG, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; KAZANDJIAN; LANDGREN, 2016; SCARFÒ; FERRERI; GHIA, 2016).

Tabela 1 - Critérios para diagnóstico de LLC.

Sangue periférico	Linfocitose (> 5000/ μ L linfócitos por mais de três meses) Linfócitos pequenos
Medula óssea	>30% de linfócitos maduros
Características imunofenotípicas	CD5 positivo, CD23 positivo, CD 22 negativo/positivo, FMC7 negativo
Alterações genômicas	deleção 13q14 (55% dos casos) trissomia do 12 (16% dos casos) deleção do 17p (7% dos casos) deleção do 11q (18% dos casos)

FONTE: SAGATYS; ZHANG, 2012; SCARFÒ; FERRERI; GHIA, 2016.

A evolução clínica é extremamente variável entre os indivíduos afetados, com sobrevivência variando de alguns meses em casos agressivos, até muitos anos em casos de LLC indolente. A decisão de tratar o paciente é orientada pelo estadiamento clínico, pela presença de sintomas e pelos sinais de atividade da doença. Os sistemas clássicos de estadiamento, Binet e Rai, são baseados em características clínicas e hematológicas (Tabela 2). Estes sistemas definem estágios baixo risco, (Binet A, Rai 0), risco intermediário (Binet B, Rai I/II) e alto risco (Binet C, Rai III/IV), com sobrevida, respectivamente: > 10 anos, 5-7 anos e 1-3 anos (GONÇALVES *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Estadiamento de Binet e Rai.

	Estádios de Binet	Estádios de Rai	Sobrevivência média
Baixo risco	A	0	> 10 anos
	Hb \geq 10 g/dL Plaquetas \geq $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ \leq 2 áreas envolvidas ^a	Linfocitose no sangue e medula óssea	
Risco intermediário	B	I	5 a 7 anos
	Hb \geq 10 g/dL Plaquetas \geq $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ \geq 3 áreas envolvidas	Linfocitose + linfadenopatia II Linfocitose + esplenomegalia e/ou hepatomegalia	
Alto risco	C	III	1 a 3 anos
	Hb < 10 g/dL Plaquetas < $100 \times 10^3/\mu\text{L}$	Linfocitose + Hb < 11 g/dL IV Linfocitose + Plaquetas < $100 \times 10^3/\mu\text{L}$	

^aÁreas envolvidas são fígado, baço e gânglios linfáticos (unilateral ou bilateral) nas regiões inguinal, axilar e cervical. Fonte: GONÇALVES *et al.*, 2009.

Os estadiamentos de Binet e Rai são fáceis de aplicar na prática clínica, mas não conseguem prever a evolução do paciente para a doença agressiva. Dos casos que inicialmente apresentam um estágio indolente, 50% evoluirão de forma agressiva com progressão rápida e morte prematura. Assim, a investigação e o estabelecimento de parâmetros prognósticos no momento do diagnóstico LLC identificariam os pacientes com alto risco de progressão rápida

da doença, apesar de apresentarem um estágio clínico indolente. Entre esses fatores de risco estão as alterações citogenéticas, o estado mutacional da imunoglobulina (IgVH) e a expressão do ZAP-70 (FALCÃO, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Parte dos pacientes diagnosticados com LLC não necessitam de tratamento, pois são diagnosticados precocemente, em uma fase assintomática e com poucas modificações celulares. Quando o caso é grave e o paciente necessita de tratamento, várias são as terapias medicamentosas indicadas: quimioterapia (Fludarabina®, Ciclofosfamida®); imunoterapia (Rituximab® e Alemtuzumab®); radioterapia e “terapia alvo” (Ibrutinib®). Apesar da eficácia sinalizada por cada um desses medicamentos, eles geram efeitos colaterais que alteram o bem-estar do paciente (SCARFÒ; FERRERI; GHIA, 2016).

A identificação de novos fatores prognósticos, além do estadiamento clínico, representa um dos avanços mais importantes na compreensão da LLC. Entre estes fatores de prognóstico pode-se citar o subgrupo de alterações cromossômicas, como 11q-, 13q-, 17p- e +12, alterações genéticas (NOTCH1, BIRC3, SF3B1, TP53), expressão de miRNA, estado mutacional de imunoglobulina (IgVH), expressão da proteína ZAP-70, expressão CD38, mecanismos apoptóticos e sinalização celular. Além disso, o tempo de duplicação de linfócitos (LDT) tem sido considerado um fator prognóstico importante, porque os pacientes com o valor de duplicação de linfócitos em um período menor que seis meses têm uma sobrevivência mediana abaixo daqueles com linfocitose estável. Esses novos fatores contribuiriam para a identificação de pacientes em estágio clínico não avançado com risco aumentado de progressão rápida da doença (VYAS; HASSAN, 2012; SHAHJAHANI *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2016).

A avaliação de biomarcadores prognósticos na LLC é extremamente importante para a identificação precoce de indivíduos cuja doença pode evoluir rapidamente e quem se beneficiaria com protocolos de tratamento mais adequados e individualizados. Neste contexto, é de grande importância o estudo da contribuição prognóstica de fatores como a expressão de miRNAs para prever a evolução da doença. Além dos miRNAs, a investigação de outros fatores prognósticos como ZAP-70, Ang-2 e os níveis plasmáticos de Bcl-2 poderão contribuir para o entendimento da patogênese e evolução da doença.

2.2 Biogênese dos miRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de cadeia simples com 19 a 25 nucleotídeos não codificadoras de proteínas. Eles atuam como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais e exercem seus efeitos reguladores ao se ligar à região 3' não traduzida do alvo de mRNA. Este mecanismo de ação leva a uma redução na tradução de proteínas, enquanto raramente afeta o nível de expressão transcricional (DOENCH; SHARP, 2004; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

O primeiro miRNA identificado foi miR lin-4, associado à regulação do desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*, um nematóide da família Rhabditidae que vive em ambientes de clima temperado. A interação entre miR lin-4 e lin-4 mRNA resulta em regulação negativa da tradução do mRNA (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; SRIVASTAVA; TSONGALIS; KAUR, 2013).

A gênese do miRNA ocorre em três estágios: transcrição do miRNA primário (pri-miRNA), transformação do precursor de miRNA no núcleo e geração do miRNA maduro no citoplasma. O processo começa com a transcrição genética pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito de pri-miRNA. O pri-miRNA tem uma estrutura de alça na sua estrutura que é clivada no núcleo pela RNase III (Drosha) e seu co-fator DGCR8 (gene da região crítica da síndrome de Di George 8), gerando pré-RNA, uma molécula precursora de miRNA maduro, com aproximadamente 70 nucleotídeos. O pré-RNA é então rapidamente transportado para o citoplasma pela exportin-5 (Exp5), uma proteína de exportação nuclear que usa GTP como cofator. No citoplasma, o pré-RNA é processado pela RNase III (Dicer), gerando um miRNA de cadeia dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este produto de miRNA é incorporado em um complexo multimérico denominado RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), que inclui as proteínas Argonautas como componentes principais. Apenas uma das duas cadeias de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional dos genes-alvo (Figura 1). A expressão alterada dos componentes da biogênese de miRNA, como Drosha, Dicer e Argonautas, tem sido associada a diferentes tumores humanos,

destacando a importância desta via no correto funcionamento celular (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006; AGUIAR *et al.*, 2010; CORTEZ *et al.*, 2012).

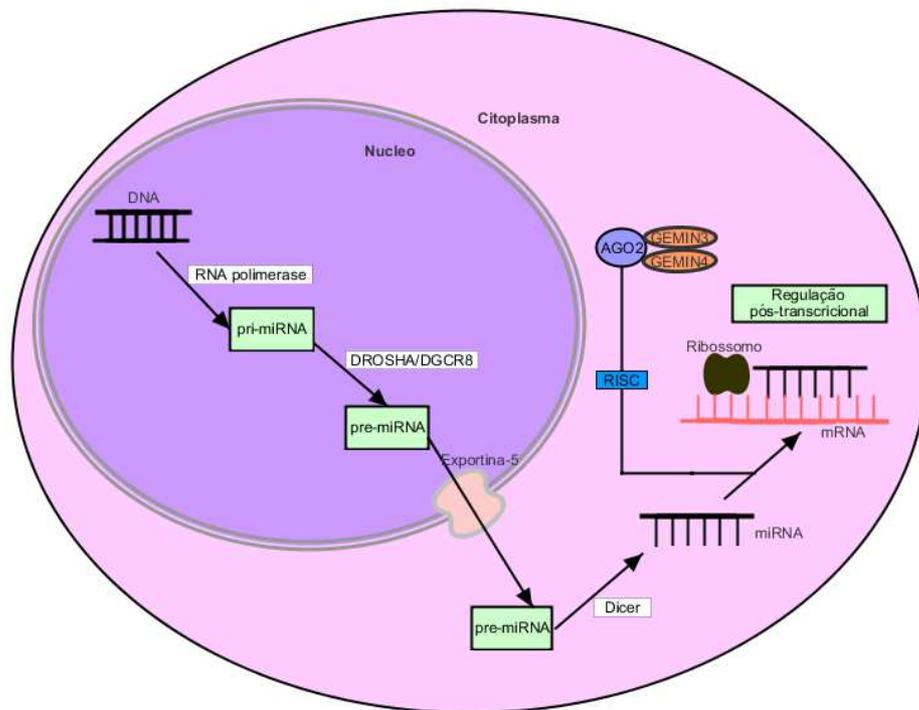


Figura 1 - Esquema da biogênese de miRNA.

Os miRNAs exercem uma regulação pós-transcricional de acordo com o grau de complementaridade com o mRNA alvo, tanto por inibição de tradução quanto por degradação de mRNA. O emparelhamento perfeito com o mRNA leva à degradação da molécula. No entanto, o grau de complementaridade imperfeita com o mRNA gera inibição da tradução alvo, sendo este o principal mecanismo de ação em mamíferos (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

Estima-se que existem cerca de mil miRNAs no genoma humano. Eles são expressos especificamente em diferentes tecidos e as mudanças nessa expressão estão associadas a diferentes patologias. Muitas funções reguladoras, incluindo a modulação da hematopoiese e a diferenciação celular em mamíferos, são coordenadas pela presença de miRNAs. A expressão alterada do miRNA está relacionada à ocorrência de vários tipos de tumores. Nos seres humanos, cerca de 50% dos genes de miRNA estão localizados em locais genômicos associados ao câncer e podem ser bons alvos terapêuticos no

desenvolvimento de novos medicamentos (MICHAEL *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004; BARTELS; TSONGALIS, 2009; BALATTI; PEKARKY; CROCE, 2015).

2.3 miRNAs na Leucemia Linfocítica Crônica

Estudos demonstraram que as alterações nos perfis de expressão de miRNA contribuem para a sobrevivência, proliferação e desenvolvimento celular na LLC. Vários miRNAs, associados a diferentes caminhos, foram correlacionados à patogênese de LLC e foram propostos como novos biomarcadores da doença, desempenhando um papel crucial na fisiopatologia e prognóstico (STAMATOPOULOS; VAN DAMME, 2015). Os perfis de miRNA também foram utilizados para avaliar o melhor protocolo de tratamento, uma vez que as alterações em alguns miRNAs estão relacionadas à resistência a fármacos (BALATTI; PEKARKY; CROCE, 2015). MiRNAs circulantes extracelulares foram detectados em fluidos corporais, como soro, plasma, saliva e urina, e podem ser usados para avaliar e monitorar a evolução dos pacientes. Vários miRNAs estão envolvidos na LLC, como o miR-15a/16-1, o miR-148a, o miR-222, o miR-21, o miR-34, o miR-155, o miR-181b, o miR-29, o miR-29c, o miR-181, o miR-29 -150, miR-223, miR-708 e miR-3676 (STAMATOPOULOS; VAN DAMME, 2015).

As alterações de miRNAs 15a e 16-1 estão ligadas ao início da LLC e também podem indiretamente alterar a expressão de outros miRNAs, como o miR-34, que leva à modulação da expressão da proteína p53. Além disso, eles regulam negativamente miR-181b e miR-29, ambos associados ao desenvolvimento de LLC agressivo (PEKARSKY; CROCE, 2010; BALATTI; PEKARKY; CROCE, 2015).

O estudo dos perfis de miRNAs tem um grande potencial de aplicação na avaliação do prognóstico LLC. O miR-150 foi empregado em previsão de sobrevivência global sem tratamento, sendo a expressão reduzida de miR-150 associada a prognósticos desfavoráveis em pacientes com LLC (STAMATOPOULOS; VAN DAMME, 2015).

A desregulamentação de miRNAs pode ter várias causas, como alterações genéticas (por exemplo, alterações cromossômicas ou epigenéticas e interação de genes) e a influência de interleucinas, imunoglobulinas, entre outras causas ainda não esclarecidas. Esta desregulação tem um grande impacto no desenvolvimento e no progresso da LLC (BALATTI; PEKARKY; CROCE, 2015).

Um padrão distinto de expressão de miRNAs composto por cinco genes (miR-186, miR-132, miR-16-1, miR-102 e miR-29c) distinguiu amostras de LLC que expressavam o gene mutado de IgVH daqueles que expressavam genes de IgVH não mutados, sugerindo que os perfis de expressão de miRNA têm significado no prognóstico da LLC. A confirmação destes resultados é a constatação de que o elemento comum entre a deleção 13q14.3 e o gene de IgVH é o miR-16-1. Este gene está localizado na região suprimida (13q14.3) e a presença deste está associada ao bom prognóstico. Estes dados de expressão de miRNA sugerem que os padrões de expressão têm relevância biológica para o comportamento clínico de LLC (CALIN *et al.*, 2004).

Zanetti e colaboradores (2007) avaliaram a expressão de miRNAs em indivíduos com LLC. Os cinco miRNAs mais altamente expressos foram miR-331, miR-29a, miR-195, miR-34a e miR-29c nos portadores de LLC. Este foi o primeiro estudo que demonstrou a associação dos miR-128B, miR-204 e miR-331 para neoplasias hematológicas.

2.4 miR-15a, miR-16-1 e Bcl-2 na Leucemia Linfocítica Crônica

A associação de miRNA com a LLC foi descrita pela primeira vez em 2002 por Calin *et al.*, onde foi relatado o envolvimento do miR-15a e do miR-16-1 na patogênese da doença. A deleção 13q14, que é a alteração mais prevalente nos pacientes com LLC, leva à deleção dos genes miR-15a e miR-16-1, além da deleção do gene DLEU2. A função DLEU2 ainda é desconhecida e a sequência de genes não mostra nenhuma homologia com qualquer outro RNA não codificante. Tanto o miR-15a como o miR-16-1 são transcritos supressores de

tumores que atuam sobre os processos de proliferação celular e apoptose (CALIN *et al.*, 2002; CIMMINO *et al.*, 2005; KLEIN *et al.*, 2010).

Na proliferação celular, o miR-15a e miR-16-1 regulam negativamente a expressão de várias proteínas que desempenham papéis importantes na transição de fase G0/G1-S. A ausência de miR-15a e miR-16-1 resulta em uma ativação mais rápida das proteínas CCND2 e CCND3, pontos críticos de controle do ciclo celular o que, por sua vez, leva à rápida fosforilação do retinoblastoma. Conseqüentemente, ocorre a entrada acelerada no ciclo celular pela ativação do E2F, indicando um fenótipo pro-proliferativo nas células deficientes no miR-15a e miR-16-1 (KLEIN *et al.*, 2010). Além disso, nos linfócitos de pacientes com LLC, a baixa expressão de miR-15a e miR-16-1 pode estar correlacionada com altos níveis de expressão da proteína Bcl-2 (Figura 2). MiR-15a e miR-16-1 inibem a expressão de Bcl-2, que é uma proteína anti-apoptótica. Em pacientes com LLC, a redução desses miRNAs leva a um aumento na expressão de Bcl-2 e, conseqüentemente, a uma redução no processo de apoptose. O aumento da sobrevivência dos linfócitos B na LLC *in vivo* foi atribuído à expressão inapropriada de proteínas da família Bcl-2 que leva à inibição do processo de apoptose, resultando no acúmulo de linfócitos clonais que caracterizam a doença (DIGHIERO, 2005; AGUIAR *et al.*, 2010; HUMPLIKOVA *et al.*, 2013; BALATTI; PEKARKY; CROCE, 2015; KAZANDJIAN; LANDGREN, 2016; ROBERTS *et al.*, 2016). A apoptose ou morte celular programada é uma via genética bem conservada. Esta forma de morte celular é essencial para a homeostase dos tecidos e para o desenvolvimento normal de organismos multicelulares. Defeitos no controle desta via estão implicados em vários distúrbios, como câncer, doenças auto-imunes e síndromes degenerativas. Os defeitos específicos na capacidade da célula de iniciar a apoptose, ou as vias de sinalização que regulam as vias apoptóticas, não só proporcionam às células cancerosas vantagens intrínsecas para a sobrevivência, como também podem conferir resistência inerente a drogas quimioterapêuticas (CORY; ADAMS, 2002; DANIAL; KORSMEYER, 2004). A Figura 2 representa um esquema da modulação de miR-15a e miR-16-1 na expressão de Bcl-2.

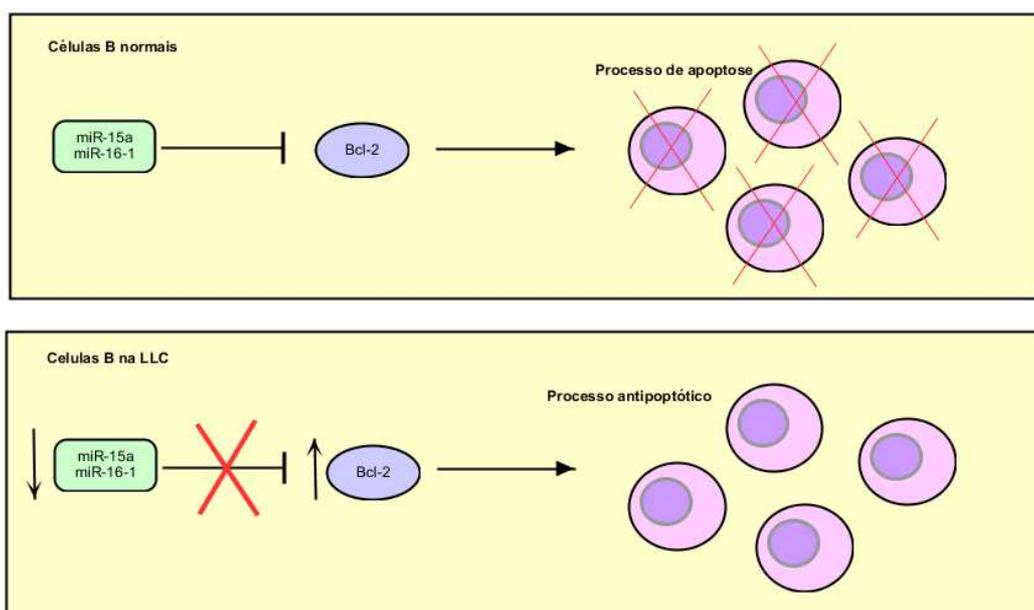


Figura 2 - Esquema da modulação de miR-15a e miR-16-1 na expressão de Bcl-2.

O processo de apoptose depende da ativação da via mitocondrial da família Bcl-2. Esta família de proteínas citoplasmáticas é caracterizada pela presença de membros que suprimem a apoptose, como Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, ou promovem apoptose como Bax, Bak, Bad, Bid, Bim e Puma (CORY; ADAMS, 2002; GOMES *et al.*, 2017). O aumento da sobrevivência de linfócitos B em LLC é considerado principalmente uma consequência da expressão inadequada de proteínas da família Bcl-2. Essencialmente, as células B de LLC expressam níveis elevados de Bcl-2 e níveis variáveis de Mcl-1, Bcl-xL, Bax e Bim. Níveis elevados de Mcl-1 e uma proporção aumentada de Bcl-2/Bax foram associados a uma resposta fraca ao tratamento (LONGO *et al.*, 2008). O desequilíbrio entre moléculas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas parece ser um dos mecanismos de resistência à apoptose em LLC e, como tal, é um fator chave que define a longevidade dos linfócitos B (PACKHAM; STEVENSON, 2005; DANILOV *et al.*, 2006).

A observação das interações entre miR-15a e miR-16-1, sugerem que esses miRNAs interferem na expressão de p53. Portanto, em pacientes com deleção de 13q, a redução de miR-15a e miR-16-1 desloca o equilíbrio para níveis mais altos de Bcl-2, molécula anti-apoptótica, e também níveis mais altos

de p53 que tem característica pró-apoptóticas. Conseqüentemente, o número de células apoptóticas diminui devido a um alto nível de Bcl-2, mas a via intacta p53 mantém o crescimento tumoral relativamente baixo. Por outras palavras, a redução do miR-15a e do miR-16-1, se, por um lado, reduz a apoptose através do Bcl-2, por outro lado, reduz o crescimento do tumor através da p53. Isso pode explicar como a deleção 13q está associada à LLC indolente. Além disso, o aumento nos níveis de p53 em pacientes com deleção de 13q leva a níveis reduzidos de ZAP-70, correlacionando-se positivamente com a sobrevida dos pacientes. A inativação de p53 já é observada em aproximadamente 15% dos pacientes e está associada à progressão da doença agressiva (KLEIN *et al.*, 2010; GONZALEZ *et al.*, 2011; BALATTI; PEKARKY; CROCE, 2015).

Os níveis de expressão dos miRNAs podem refletir diferenças entre células B normais e malignas, uma vez que as alterações na sua expressão podem desempenhar um papel importante na gênese e evolução das neoplasias malignas linfóides (ZANETTE *et al.*, 2007). A variação nos perfis de expressão de miRNAs tem sido associada à presença de mutações nos genes IgVH, presentes em 50% a 70% dos pacientes com LLC, deleções em 13q14 que é encontrado em 50% dos casos de LLC e expressão de ZAP-70 (CALIN *et al.*, 2004; DEL PRINCIPE *et al.*, 2006; CALCAGNO *et al.*, 2016). Assim, a caracterização de miRNAs e outros biomarcadores ampliaria o espectro de marcadores prognósticos ligados à progressão da doença e à resistência aos medicamentos na LLC.

Em suma, o papel e as funções do miRNAs durante a patogênese da LLC ainda não foram completamente elucidados. No entanto, nas formas indolentes de LLC, a deleção 13q14, que é a deleção mais frequente nesta doença, resulta em expressão reduzida de miR-15-a e miR-16-1 favorecendo o aumento de Bcl2 e p53. Também foi relatada uma correlação entre a redução de miR-15-a e miR-16-1 e a presença de mutações em genes de IgVH, uma característica de pacientes com manifestações clínicas menos agressivas da doença.

2.5 Angiogênese e Zap-70

A angiogênese é o processo fisiológico que envolve o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Em indivíduos normais a angiogênese participa no crescimento e desenvolvimento do organismo, especialmente na cicatrização de feridas e gravidez. A angiogênese nos processos patológicos é essencial para a expansão de tumores sólidos superiores a 2,0mm³ de tamanho. Evidências também indicam a existência de alterações na angiogênese em doenças malignas hematológicas, incluindo a LLC (XIA *et al.*, 2012).

A família de fatores de crescimento angiopoietina (Ang) inclui quatro membros, Ang-1, Ang-2, Ang-3 e Ang-4, os quais se ligam ao receptor endotelial da tirosina-quinase Tie2. A angiopoietina-2 é uma glicoprotina de 75 kDa, sendo que sua expressão é induzida por fatores tais como fator de crescimento endotelial (VEGF) e a hipóxia. O principal papel da Ang-2 na angiogênese é a sua ação sinérgica com VEGF. A Ang-2 ativa as células endoteliais e desestabiliza a estrutura do vaso, em seguida, o VEGF promove a proliferação das células endoteliais e migração, permitindo a formação de novos vasos. Na ausência de VEGF, a Ang-2 promove a regressão vascular (MAFFEI *et al.*, 2010; XIA *et al.*, 2012).

A hipóxia é um estímulo angiogênico fundamental em situações fisiológicas e patológicas associadas com a neovascularização. Foi demonstrado, *in vitro*, que células de LLC são capazes de aumentar a secreção de VEGF e Ang-2 quando submetidas à condição de hipóxia. A redução prolongada da tensão de oxigênio no tecido normal desencadeia uma cascata de respostas compensatórias que resultam na formação de novos vasos melhorando a oxigenação tecidual (MAFFEI *et al.*, 2010; XIA *et al.*, 2012; FLEITAS *et al.*, 2013)

Fatores angiogênicos, como o VEGF, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoietina-2 (Ang-2), proteinases extracelulares trombospondina-1 (TSP-1) e metaloproteinase-9 (MMP-9), participam da neovascularização modular e da regulação dos efeitos pró-sobrevivência das células LLC (XIA *et al.*, 2012).

Na LLC a proteína Ang-2 é secretada pelas células leucêmicas e induz o aumento da angiogênese. Concentrações elevadas de Ang-2 foram associadas com estágio avançado da doença e menor sobrevida dos pacientes. Nos pacientes classificados nos estágios B e C de Binet foram encontrados níveis mais elevados de Ang-2 quando comparados aos pacientes do estágio A (HÜTTMANN *et al.*, 2006; MAFFEI *et al.*, 2010; SAGATYS; ZHANG, 2012)

Também relacionada a estágios mais graves da doença pode-se citar a expressão aumentada de ZAP-70. O gene localizado no braço curto do cromossomo 2 codifica uma proteína tirosino kinase de 70 kDa (ZAP-70), essencial na transdução da sinalização dos linfócitos T. Essa proteína intracelular encontra-se associada à cadeia zeta do complexo do receptor de células T (TCR), do qual deriva seu nome ZAP (zeta associated protein). A célula de origem da LLC é um progenitor linfóide, comprometida com a linhagem B, porém com algumas características de linfócitos T, expressas de forma anormal (MACHADO, 2009).

Pacientes com LLC apresentam supressão da função de célula T à medida que ocorre a progressão da doença. No processo de supressão de célula T é observado distúrbios no timo e expressão anormal de receptor de célula T (TCR). Alterações na expressão do gene CD3 ocasionam tradução errônea do TCR. No processo de sinalização de resposta do TCR estão envolvidas as 4 famílias de tirosinas quinase, Csk quinases, Src quinases, Tec quinases e ZAP-70. Após estímulo do TCR, a proteína citosólica ZAP-70 é enviada para a membrana de células T, onde são normalmente encontradas. Nos pacientes com LLC, os linfócitos B também expressam o gene da proteína ZAP-70 (MACHADO, 2009; HUANG *et al.*, 2012).

Apesar de não ser encontrada em linfócitos B normais, a ZAP-70 é expressa em células de LLC em que o gene IgVH não está mutado. Linfócitos de LLC com mutação no IgVH raramente mantêm a expressão desta proteína. Na avaliação prognóstica, a ZAP-70 tem sido avaliada como substituta do estado de não mutação do gene IgVH, correlacionando-se com doença mais agressiva (GARICOHEA, 2005; YAMAMOTO, 2005; MACHADO, 2009). O estado mutacional do gene que codifica a expressão da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (IgVH) é um importante marcador de prognóstico. Pacientes com mutação no gene IgVH apresentam prognóstico favorável, já

pacientes sem mutação possuem evolução desfavorável (MACHADO, 2009; WILLIAM *et al.*, 2002).

3. JUSTIFICATIVA

A mediana de sobrevida dos pacientes com LLC é de 10 anos, no entanto, o prognóstico é bastante variável, e alguns evoluem com curta sobrevida (DE FARIA *et al.*, 2000; HALLEK, 2008; ROWSWELL-TURNER *et al.*, 2017). Os sistemas de estadiamento, Rai e Binet, não permitem prever a taxa de progressão da doença em pacientes em estágios iniciais nem a probabilidade de resposta ao tratamento naqueles de estágio mais avançado (VASCONCELOS, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2009). Tal fato tem estimulado a investigação de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico, prognóstico e conduta terapêutica nestes pacientes.

A aplicação dos dois sistemas de estadiamento na prática clínica é fácil, pois ambos dependem apenas de exame físico e hemograma, mas as variações evolutivas individuais não podem ser previstas. Dessa forma, avaliar marcadores biológicos de diagnóstico e prognóstico na LLC torna-se de extrema importância para identificação precoce dos indivíduos que apresentarão doença de rápida evolução e que podem se beneficiar de protocolos de tratamento mais agressivos.

Os níveis de expressão dos miRNAs podem apontar diferenças entre células normais e células B malignas, uma vez que alterações na sua expressão podem desempenhar um papel importante na gênese e evolução das doenças malignas linfóides (ZANETTE *et al.*, 2007). Variação no perfil de expressão dos miRNAs tem sido associado com a presença de mutações nos genes IgVH, com deleções em 13q14 e com a expressão da ZAP-70 (CALIN *et al.*, 2004). Portanto, a avaliação dos miRNAs poderá ampliar o espectro de marcadores prognósticos em LLC.

É importante avaliar a participação de proteínas apoptóticas na sobrevida de linfócitos B e na evolução da patologia, e também correlacionar a imunodeficiência encontrada nos pacientes com o processo de angiogênese e a expressão de Zap-70. Acredita-se que os resultados de tais pesquisas ajudarão a esclarecer a relação dos eventos regulatórios e o desenvolvimento e evolução das alterações neoplásicas hematológicas, bem como poderão contribuir futuramente desenvolvimento de uma alternativa que leve a melhor compreensão do prognóstico e escolha de terapêutica eficaz para os pacientes com LLC.

Diante do exposto acima, uma melhor caracterização dos pacientes com LLC em nosso meio, permitirá traçar um perfil dos mesmos em relação aos fatores prognósticos citados, em função do estadiamento da doença.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar fatores prognósticos da LLC e sua relação com o estadiamento e processo evolutivo da doença.

4.2 Objetivos específicos

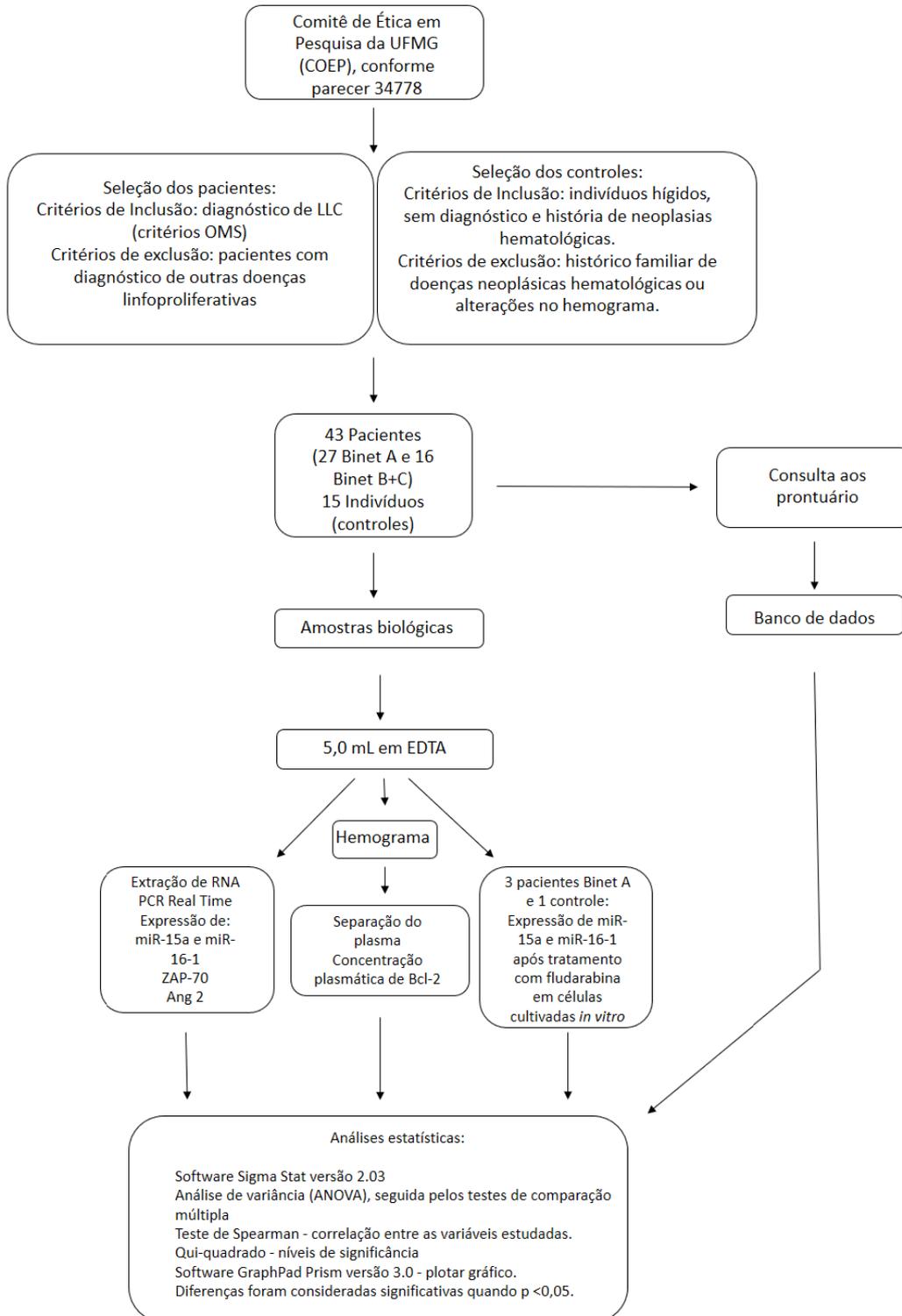
- 4.2.1 Avaliar a expressão de miR-15a e miR-16-1 em pacientes com LLC comparado a um grupo controle.
- 4.2.2 Avaliar os níveis plasmáticos de Bcl-2 em pacientes com LLC comparado a um grupo controle.
- 4.2.3 Avaliar a expressão de ZAP-70 em pacientes com LLC comparado a um grupo controle.
- 4.2.4 Avaliar a expressão de Ang-2 em pacientes com LLC comparado a um grupo controle.
- 4.2.5 Determinar o tempo de duplicação de linfócitos em pacientes com LLC.
- 4.2.6 Relacionar os dados obtidos pelas análises moleculares com os parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes.
- 4.2.7 Realizar estudos de comparação e correlação entre todos os parâmetros avaliados.

4.2.8 Avaliar a interferência do tratamento com fludarabina na expressão de miR-15a e miR-16-1, em células *in vitro* de pacientes com LLC.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento experimental

Para um melhor entendimento do delineamento experimental, encontra-se abaixo um fluxograma com todas as etapas do presente estudo.



O presente estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) foram aprovados sob o ponto de vista ético e formal pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), conforme parecer 34778 (Anexo 2). Este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki (“World Medical Association Declaration of Helsinki”, 2013). O esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando-se linguagem clara e destacando-se a participação voluntária foi realizado com os pacientes e seus familiares envolvidos no estudo, durante o período de coleta das amostras. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtida no momento da coleta de sangue.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos a partir das anotações nas fichas clínicas, além de informações contidas no sistema computadorizado e prontuários arquivados no hospital.

5.2 Casuística

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados pelos médicos hematologistas do Setor de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Ambulatório Borges da Costa, para a coleta de amostra biológica que ocorreram entre agosto de 2014 e fevereiro de 2016. Foram incluídos todos os pacientes com diagnóstico de LLC, atendidos no período descrito acima e que aceitaram participar do estudo. A realização desta pesquisa não interferiu em nenhuma conduta clínica ou terapêutica.

A população de estudo compreendeu 43 pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) com idade média de 68,1 anos (faixa etária 29 – 88 anos); 28 do sexo masculino e 15 do sexo feminino. O diagnóstico foi realizado através de avaliação clínica, hemograma e imunofenotipagem. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a classificação de Binet:

- ✓ Binet A: 27 pacientes
- ✓ Binet B+C: 16 pacientes

O grupo controle foi composto por 15 indivíduos saudáveis, moradores da comunidade em geral e nível sócio-econômico similar aos pacientes, doadores

voluntários de sangue periférico, com idade média de 67,7 anos (faixa etária 32-91 anos); 9 do sexo masculino e 6 do sexo feminino.

5.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de LLC selecionados por médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, de acordo com critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), estadiamento da LLC pela Classificação do Grupo de Trabalho Internacional (Binet) (SWERDLOW *et al.*, 2015). Para o grupo controle foram incluídos indivíduos aparentemente hígidos, sem diagnóstico e história de neoplasias hematológicas. Para maior confiabilidade foram feitos hemogramas desses indivíduos, cujos resultados se mostraram dentro dos valores de referência.

5.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico de outras doenças linfoproliferativas como Leucemia prolinfocítica, Leucemia de células pilosas, Linfoma esplênico com linfócitos pilosos e Leucemia plasmocítica, além dos Linfomas Hodgkin e não-Hodgkin. Para o grupo controle, foram excluídos os indivíduos com histórico familiar de doenças neoplásicas hematológicas e com alterações significativas no hemograma.

5.3 Amostra biológica

Foi coletada, de cada paciente amostra de sangue periférico em tubo do sistema Vacutainer (BD Vacutainer®), sendo 5,0 mL em EDTA K2. O mesmo

procedimento realizado no grupo de pacientes foi realizado no grupo controle. As amostras foram transportadas em maleta apropriada para transporte de material biológico, tendo sido as amostras processadas o mais rápido possível no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os hemogramas foram realizados pelo sistema automatizado (T890 Coulter). Antes desse exame ser processado, uma parte dessa amostra de sangue total foi separada para extração de RNA e, posteriormente, foi realizada a separação de plasma, em centrífuga a 2500 rpm durante 10 minutos. O plasma foi dividido em alíquotas de 300µL e armazenado em freezer à -80° C, até o momento do uso. Todos os testes foram realizados com amostras descongeladas uma única vez. Para a avaliação da expressão de miR-15a e miR-16-1 após tratamento com fludarabina em células cultivadas in vitro, foi coletado, em três pacientes Binet A e em um indivíduo controle, mais um tubo de sangue periférico em EDTA e posteriormente realizada a técnica de separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

5.4 Preparo do banco de dados

As fichas clínicas dos pacientes foram parcialmente preenchidas no ato da coleta de sangue, com os dados pessoais dos pacientes por auto-relato e, posteriormente, os prontuários foram consultados para a obtenção de dados da evolução clínica, desde a data do diagnóstico até o momento da coleta de sangue. Os parâmetros coletados foram utilizados para elaboração de um banco de dados, com informações relativas à idade, sexo, data do diagnóstico, classificação de Binet, hemograma realizado 12 meses antes da coleta (para cálculo do tempo de duplicação de linfócitos) e informações sobre realização de tratamento quimioterápico antes da coleta.

5.5 Métodos

5.5.1 Extração de RNA

A etapa de extração de RNA foi padronizada utilizando o reagente fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol LS Reagent, Invitrogen®, Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA). Após centrifugação vigorosa, os leucócitos foram lisados e o RNA mensageiro purificado conforme protocolo do fabricante. O RNA foi recuperado da fase aquosa pela adição de clorofórmio e centrifugação, seguida de precipitação com isopropanol e nova centrifugação. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso com água livre de RNAase e DNAase.

5.5.2 Quantificação de RNA

Uma alíquota de 1,0 µL de cada amostra de RNA total foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro (Nanovue) usando-se comprimento de onda de 260 nm e 280nm.

A pureza das amostras foi verificada a partir da relação 260/280 nm, considerando a relação (260/280) das densidades ópticas (OD) igual ou maior que 1,8, como referência de boa qualidade para uso.

A quantificação de RNA é recomendável para avaliar a qualidade do RNA extraído e verificar se este está adequado para as análises.

5.5.3 Síntese do DNA complementar

Para a avaliação da expressão do miRNA, o cDNA foi obtido a partir da utilização do kit TaqMan® MiRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific). Foram usados 5,0 µL de RNA (10 ng/µL) e o ciclo: 16

°C por 30 min; 42 °C por 30 min; 85 °C por 5 min; finalizando a 4 °C, no Termociclador (Amplitherm TX25).

O cDNA foi obtido utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Foi adicionada uma alíquota de 2 µL de cada iniciador 10 × RT (Random Primers) em cada tubo e, em seguida, adicionado 0,8 µl do mix RNA RT (Tabela 1). Em cada tubo de RT foram adicionados 30 ng da amostra de RNA. O volume final de reação foi de 20 µL por tubo. Os tubos foram devidamente fechados e centrifugados. Para a síntese do cDNA a reação foi incubada a 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; seguido de aquecimento a 85°C por 5 min para desnaturação da enzima empregada e os tubos foram armazenados a - 80 ° C até o momento de uso.

O cDNA sintetizado foi avaliado através do gel de agarose a 2% (Figura 3).

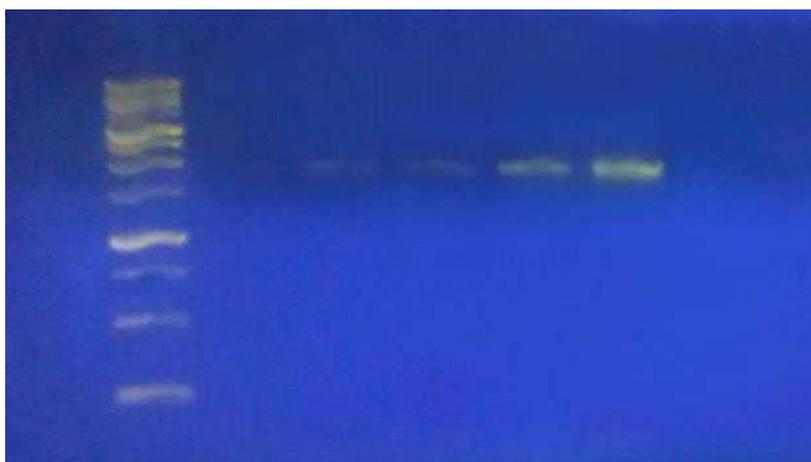


Figura 3 - Gel de agarose para avaliação do cDNA.

5.5.4 Avaliação da expressão de miRNA

A PCR em tempo real foi empregada para quantificação relativa dos genes miR-15a e miR-16-1, utilizando-se o kit TaqMan® miRNA assays Human (Applied Biosystems) e o programa utilizado no processo de amplificação das amostras foi padronizado. Na mistura de reação utilizou-se 5,0 µL de reagente TaqMan® (10X), 0,5 µL de sonda (20X) (específica para miR-15a, miR-16-1 e

gene endógeno RNU-48), 2,5 μ L de água livre de nuclease e 2,0 μ L de cDNA obtido anteriormente. A reação foi realizada utilizando o aparelho *StepOne* Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A quantificação de cada amostra foi realizada em duplicata e o método utilizado foi o de comparação de $\Delta\Delta CT$, considerando a razão entre o gene do miRNA testado e o gene endógeno de miRNA, RNU-48, em relação à amostra controle. Para testar a eficiência e amplificação do gene endógeno RNU-48, diluições seriadas de cDNA foram testadas, e os resultados da reação, expressos em CT e plotados em gráfico da curva padrão (Figura 4).

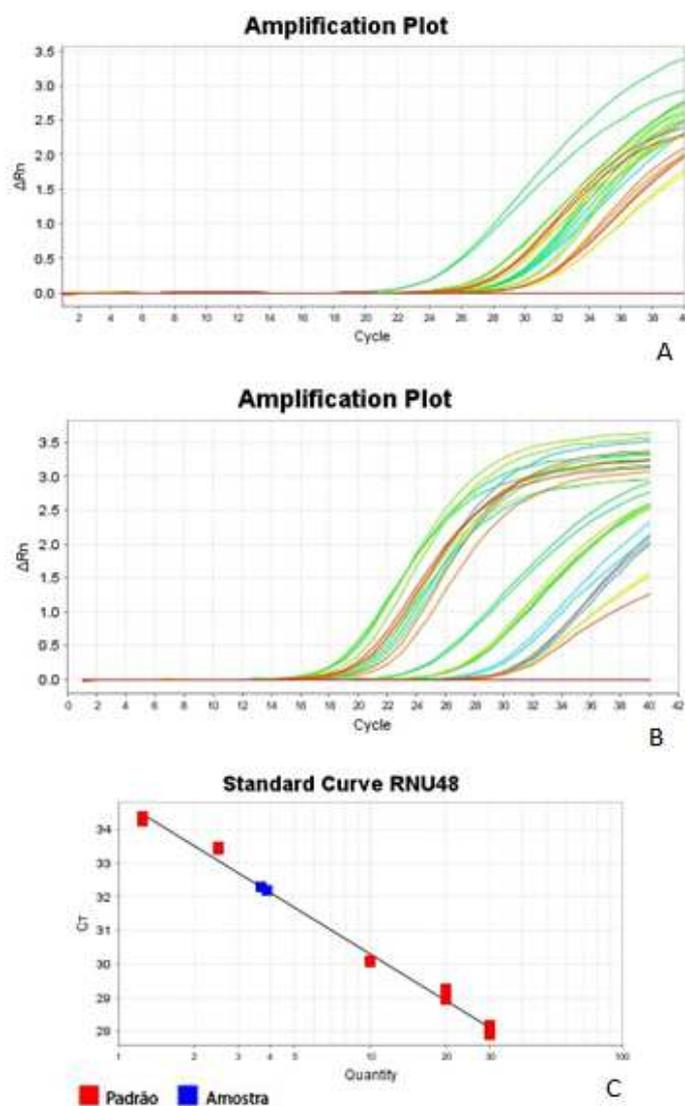


Figura 4 - Quantificação da expressão do endógeno RNU48 pela PCR em tempo real. (A) Gráfico da amplificação de miR-15a. (B) Gráfico da amplificação de miR-16-1. (C) Gráfico da curva padrão (coeficiente de correlação de 0,992; inclinação de reta -4,06; Ef 104,62%).

5.5.5 Avaliação da concentração plasmática de Bcl-2

Os níveis plasmáticos de Bcl-2 foram determinados por um kit ELISA comercial (Human Bcl-2 Platinum ELISA - eBioscience © 2017 Thermo Fisher Scientific Inc.). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O princípio do teste se baseia na ligação de antígenos Bcl-2 em anticorpos monoclonais anti-Bcl-2 humano adsorvidos na superfície de micro poços de uma placa de ELISA. Produto colorido foi formado em proporção à quantidade de Bcl-2 humano presente na amostra ou padrão. A reação foi finalizada pela adição de ácido e a absorvância foi medida a 450 nm utilizando-se o leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader - MOLECULAR DEVICES (USA). Uma curva padrão (Figura 5) foi preparada a partir de 7 diluições (32,0 ng/mL até 0,5 ng/mL) do padrão de Bcl-2 humanas ($y=0,0652x-0,0125$; $R^2 = 0,9953$) e determinou-se a concentração de amostra de Bcl-2 humana.

Amostras de pacientes e grupos de controle, em diluição 1:5, foram realizadas simultaneamente e os ensaios foram cegos. Os valores são representados como Bcl-2 ng/mL no plasma.

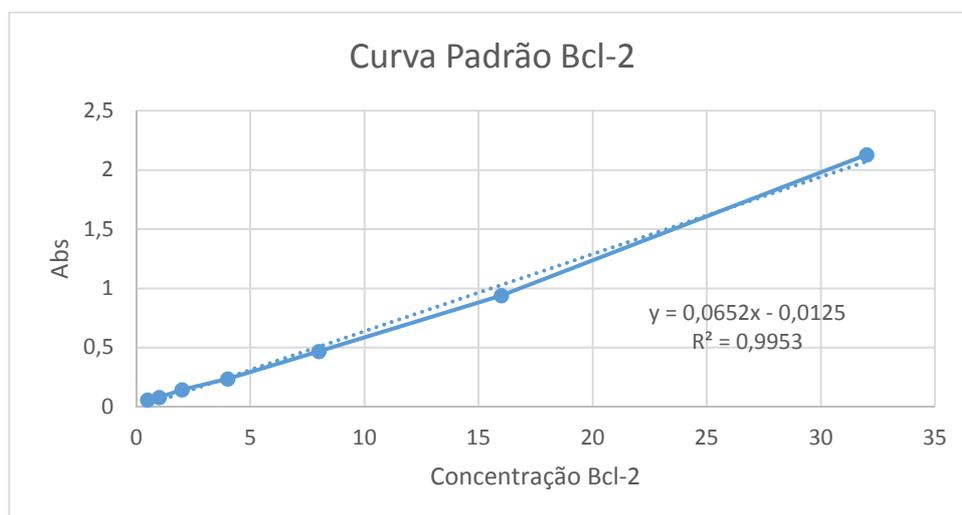


Figura 5 - Gráfico da curva padrão da dosagem plasmática de Bcl-2.

5.5.6 Avaliação da expressão de ZAP-70

A avaliação da expressão de ZAP-70 foi realizada a PCR em tempo real utilizando-se o fluoróforo SYBR® Green. Para alcançar alta eficiência, o procedimento foi padronizado, através da identificação da temperatura ideal de anelamento para cada sequência de oligonucleotídeos (Tabela 3) analisados. Essa padronização foi realizada através de PCR convencional, no qual as reações foram processadas em um termociclador (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), no qual as reações de amplificação compreendem uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 0,5 minutos, anelamento no qual a temperatura vai ser determinada por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72 °C por 10 minutos. A segunda padronização foi a titulação dos oligonucleotídeos iniciadores, ou seja, realizou-se uma série de reações em que se varia a concentração dos iniciadores, o que possibilita a escolha da concentração mais adequada. Para isso, foram feitas diluições dos iniciadores, que variaram entre as concentrações de 100 a 600 nanomolar (nM). Todas as reações foram feitas em triplicatas, com controles negativos para cada combinação de iniciadores. As condições encontradas foram posteriormente testadas na construção de uma curva melt utilizando o gene endógeno GAPDH (Figura 6).

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na PCR em tempo real.

Primer	Sequências
ZAP-70-f	5'-CGCTGCACAAGTTCCTGGT-3'
ZAP-70-r	5'-GACACCTGGTGCAGCAGCT-3'
GAPDH-f	5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3'
GAPDH-r	5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'

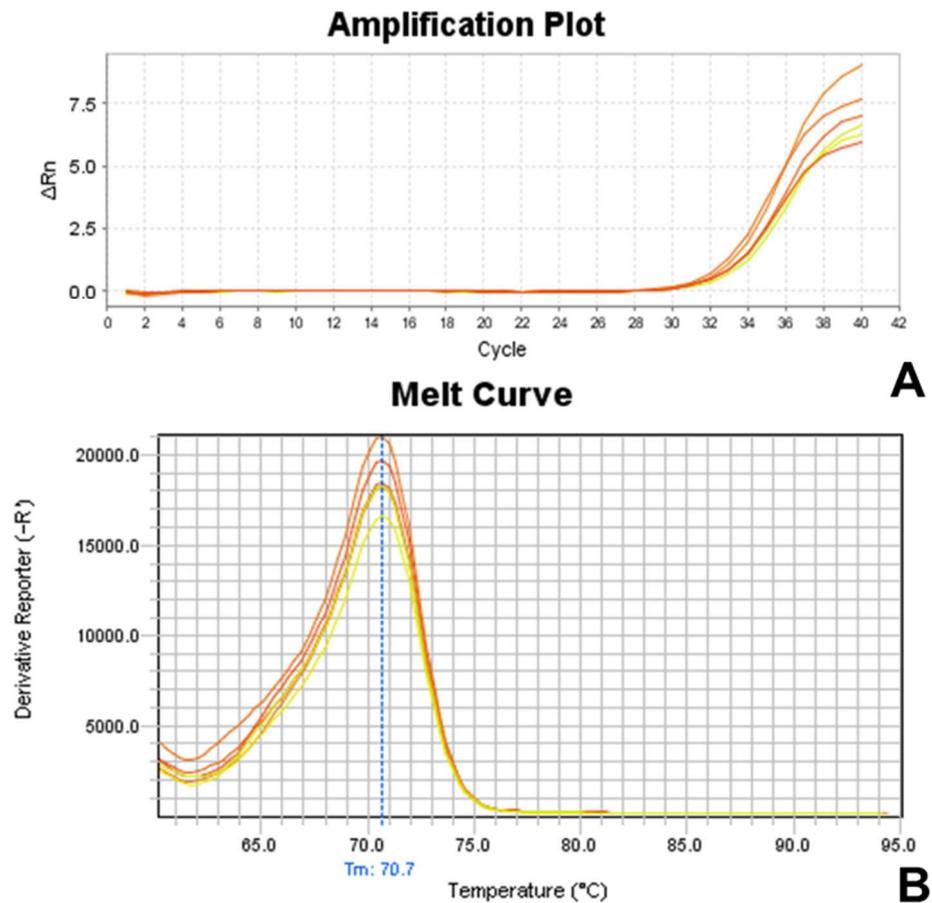


Figura 6 - Quantificação da expressão do endógeno GAPDH pela PCR em tempo real. (A) Gráfico da amplificação de GAPDH. (B) Curva melt.

Após o término da padronização foram realizadas reações de PCR em tempo real para o cálculo da expressão gênica relativa, utilizando-se o método do $\Delta\Delta CT$ comparativo. Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em equipamento StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), utilizando kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Este kit contém todos os componentes (exceto oligonucleotídeos iniciadores, amostras e água), necessários para as reações de PCR: tampão 2X, dNTPs, $MgCl_2$, SYBR Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA polimerase e ROX como referência passiva. Os passos do ciclo de amplificação foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 60 °C por 1 minuto, em um total de 40 ciclos.

5.5.7 Avaliação da expressão de Ang-2

A obtenção do cDNA foi realizada utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), aproveitando 10 µL de RNA (100 ng/µL) e o seguinte ciclo: 25 °C por 10 min; 37 °C por 120 min; 85 °C por 5 min; sendo finalizado a 4 °C, no Termociclador sem Gradiente (Amplitherm TX25).

Os cDNAs dos pacientes e controles foram utilizados no ensaio de PCR em tempo real usando o oligonucleotídeo (primer) do gene angiopoetina-2 (Ang-2, Taqman, Applied Biosystems®). O programa utilizado no processo de amplificação das amostras foi padronizado. Foi empregado como controle de qualidade da amplificação e da síntese de cDNA o gene endógeno GAPDH. Os cDNAs foram amplificados e sua quantificação relativa foi feita por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando-se o kit Taqman (Applied Biosystems®), conforme protocolo, e o aparelho *StepOne* Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A quantificação de cada amostra foi realizada em duplicata e o método utilizado foi o de comparação de $\Delta\Delta CT$, considerando a razão entre o gene do miRNA testado e o gene endógeno (GAPDH) em relação à amostra controle.

Para validar a quantificação da expressão é importante que todas as reações de PCR ocorram em condições ótimas e similares. Para testar a eficiência e amplificação do gene endógeno GAPDH, diluições seriadas de cDNA foram testadas, e os resultados da reação, expressos em CT e plotados em gráfico da curva padrão (Figura 7).

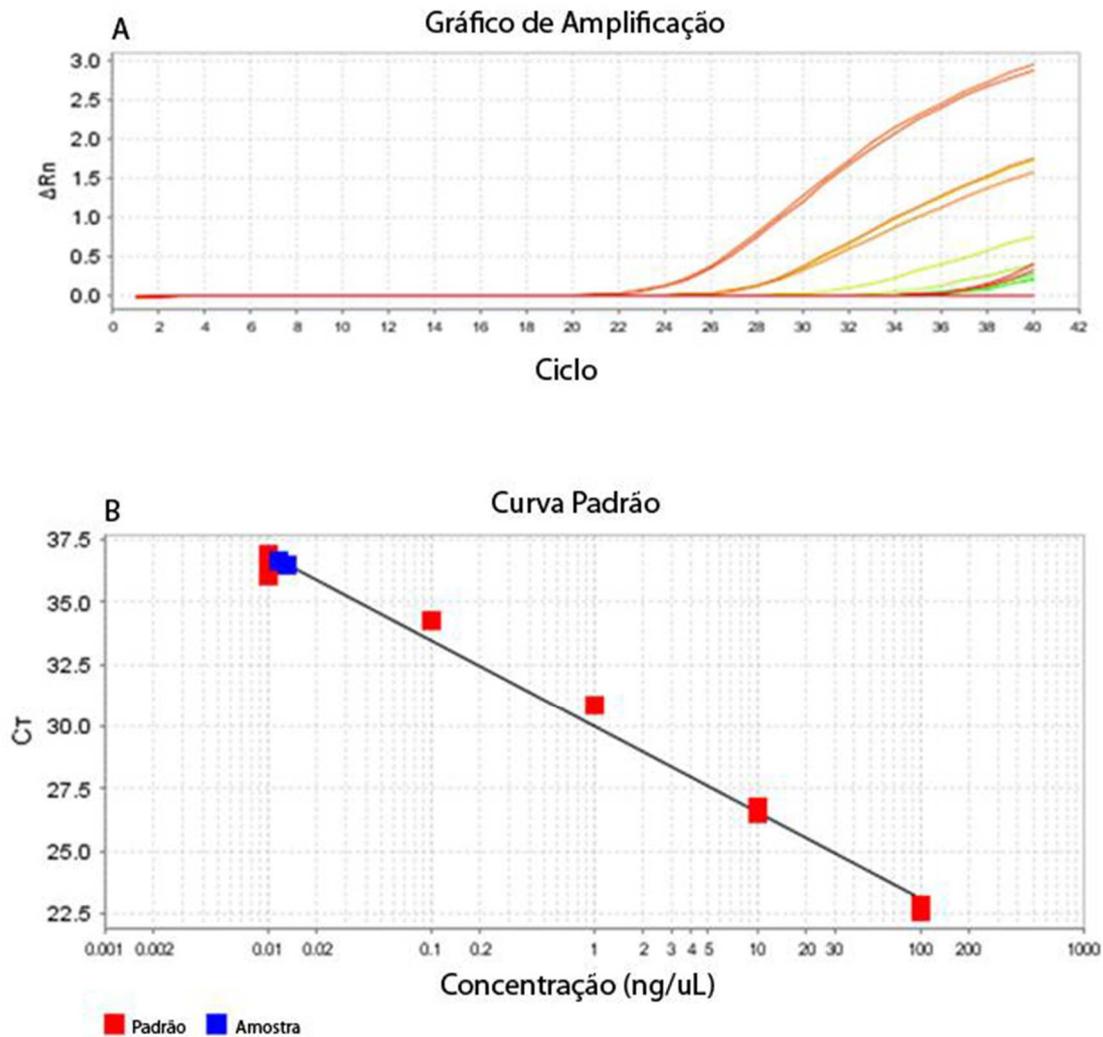


Figura 7 - Quantificação da expressão do endógeno GAPDH pela PCR em tempo real. (A) Gráfico da amplificação, contendo diferentes quantidades iniciais de cDNA variando de 100 a 0,01 ng/ μ L. (B) Gráfico da curva padrão (coeficiente de correlação de 0,991; inclinação de reta -3,45; Ef 94,901%).

5.5.8 Avaliação da expressão de miR-15a e miR-16-1 in vitro após tratamento com fludarabina

5.5.8.1 Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Após a coleta do sangue periférico, foi realizado hemograma e posteriormente as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isolados por centrifugação em gradiente de densidade usando Ficoll (Sigma Diagnostics, Inc., Missouri, EUA), que é um polissacarídeo ramificado que promove a agregação de hemácias e granulócitos, gerando uma separação por gradiente de concentração.

Em uma capela de fluxo laminar, a amostra e os materiais (devidamente esterilizados) foram acondicionados. O sangue foi transferido do tubo de coleta para um tubo Falcon e uma quantidade idêntica de meio de cultura celular RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino foi utilizada para diluí-lo. Cerca de 10mL de Ficoll® foram adicionados em um tubo Falcon de 50mL e sobre este foi vertida a amostra de sangue diluída em meio RPMI. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 20°C por 40 minutos (1200 rpm). Após a centrifugação, com cuidado, foi coletado o anel de PBMC e, em seguida, transferido para um novo tubo Falcon de 50mL. Neste foi adicionado meio de cultura celular RPMI para lavar as células. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 4°C (1500 rpm). O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso em meio de cultura RPMI a 10% de soro fetal bovino, homogeneizado e, em seguida, transferido para as garrafas de cultura celular. As células foram cultivadas a 37 °C e 5 % de CO₂.

5.5.8.2 Avaliação da IC50 da fludarabina

Para avaliar a atividade citotóxica da fludarabina (Fosfato de Fludarabina, Sigma Aldrich) foi utilizado o método de citotoxicidade, no qual, consiste em

medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células permanecem vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) levando a redução desta molécula para originar o azul de formazam. A leitura da quantidade de azul de formazam formado foi medida por espectrofotometria em 550 nm (Espectrofotômetro SpectraMax Plus – Molecular Devices, EUA). As PBMCs foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 5×10^6 células por poço, tratadas com concentrações crescentes de fludarabina diluída (100; 10; 1; 0,1 μ M) no mesmo meio de cultura por um período de 48h. Em seguida, 20 μ L do reagente MTT na concentração de 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e após três horas a 37 °C, DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazam. As absorbâncias foram lidas em 550 nm e a concentração que inibe 50% o crescimento das células (IC50) na presença de fludarabina foi determinada em comparação com células cultivadas sem o fármaco (consideradas 100% de crescimento).

5.5.8.3 Avaliação da expressão de miR-15a e miR-16-1

A fludarabina foi incubada juntamente com 1×10^7 células/poço na concentração de IC50 (23,25 μ M) por 48 horas. Posteriormente, o RNA total das células foram extraídos usando-se Trizol LS (Introgen, EUA), confeccionou-se os cDNAs e realizou-se as reações de PCR em tempo real para a análise da expressão gênica dos miR-15a e miR-16-1, conforme já descrito anteriormente.

5.6 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelos testes de comparação múltipla utilizando o software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). O teste de Spearman foi utilizado para

investigar a possível correlação entre as variáveis estudadas. Os níveis de significância foram estimados pela aplicação do teste do qui-quadrado. O software GraphPad Software, La Jolla California USA foi usado para cálculo de outlier (site: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

O presente estudo avaliou 43 pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) com idade média de 68,1 anos (faixa etária 29 – 88 anos); 28 do sexo masculino e 15 do sexo feminino. Os pacientes possuíam de 1 a 129 meses de diagnóstico com valor médio de 49 meses. Os dados clínicos e laboratoriais dos integrantes do estudo estão apresentados na Tabela 4. Os pacientes foram separados em dois grupos de acordo com o estadiamento de Binet, sendo assim apresentando características clínicas e evolução da doença semelhantes.

Foram observadas diferenças significativas na análise do hemograma quando comparado os grupos de pacientes e Controle. Diferenças significativas foram encontradas na contagem eritrócitos (Binet A *versus* Binet B+C e Binet B+C *versus* Controle, $p < 0,05$), na concentração de hemoglobina (Binet A *versus* Binet B+C e Binet B+C *versus* Controle, $p < 0,05$), na contagem de plaquetas (Binet A *versus* Binet B+C; Binet A *versus* Controle e Binet B+C *versus* Controle, $p < 0,05$), na contagem de leucócitos (Binet A *versus* Binet B+C e Binet B+C *versus* Controle, $p < 0,05$) e na contagem de linfócitos (Binet A *versus* Controle e Binet B+C *versus* Controle, $p < 0,05$).

Tabela 4 - Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LLC e controle.

	Binet A	Binet B+C	Controle	P
Idade (anos)*	67,95 ± 13,28	68,49 ± 13,29	67,71 ± 15,75	0,987
Masc/Fem	16/11	13/3	9/6	0,913
Eritrócitos**(10 ⁶ /mm ³)	4,47 (3,99 – 4,99)	3,63 (3,21 – 4,21)	4,70 (4,50 – 5,13)	< 0,050 a,c
Hemoglobina*(g/dL)	13,43 ± 2,08	10,94 ± 2,14	13,43 ± 1,57	< 0,050 a,c
Plaquetas** (10 ³ /mm ³)	157,00 (132,00 – 197,00)	106,00 (72,50 – 139,25)	230,00 (185,00 – 251,00)	< 0,050 a,b,c
Leucócitos**(10 ³ /mm ³)	20,65 (8,55 – 41,92)	17,90 (6,97 - 48,52)	5,8 (0,3 – 6,6)	< 0,050 a,c
Linfócitos** (10 ³ /mm ³)	16,19 (4,76 – 35,67)	16,63 (4,87 – 39,76)	2,51 (2,17 – 2,65)	< 0,050 b,c
TDL	2 (7,41%)	3 (18,75%)	NA	0,600

a A x B+C; b A x Controle; c B+C x Controle; Masc: masculino; Fem: feminino; *: média ± SD; **: Mediana e intervalo interquartilico ; TDL: tempo de duplicação de linfócitos; NA: não se aplica.

No momento da coleta, 18,5% dos pacientes Binet A e 25% dos pacientes Binet B + C estavam em tratamento com clorambucil ou fludarabina. Na análise

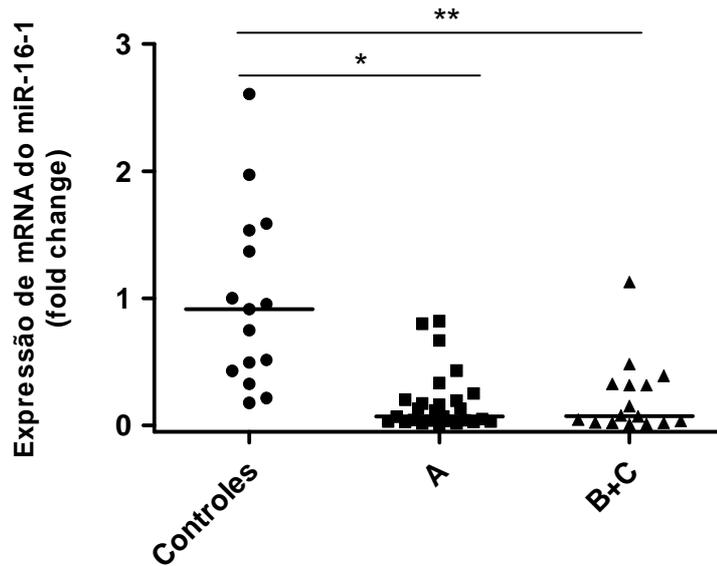


Figura 9 - Expressão de miR-16-1 no grupo Controle, Binet A (A) e Binet B+C (B+C). Barras horizontais representam a média da expressão de miR-16-1. * $P < 0.001$: expressão de miR-16-1 foi maior no grupo Controle quando comparado ao grupo Binet A. ** $P < 0.001$: expressão de miR-16-1 foi maior no grupo Controle quando comparado ao grupo Binet B+C. Não foi encontrada diferença significativa quando comparado o grupo Binet A e o grupo Binet B+C.

A mediana dos níveis plasmáticos de Bcl-2 na análise dos grupos foram 70,90 ng/mL para grupo Binet A, 72,51 ng/mL para grupo Binet B+C e 49,44 ng/mL para grupo Controle. Diferenças significativas foram observadas ao comparar o grupo Binet A e o grupo Controle e o grupo Binet B+C e o grupo Controle ($p < 0,001$) (Figura 10).

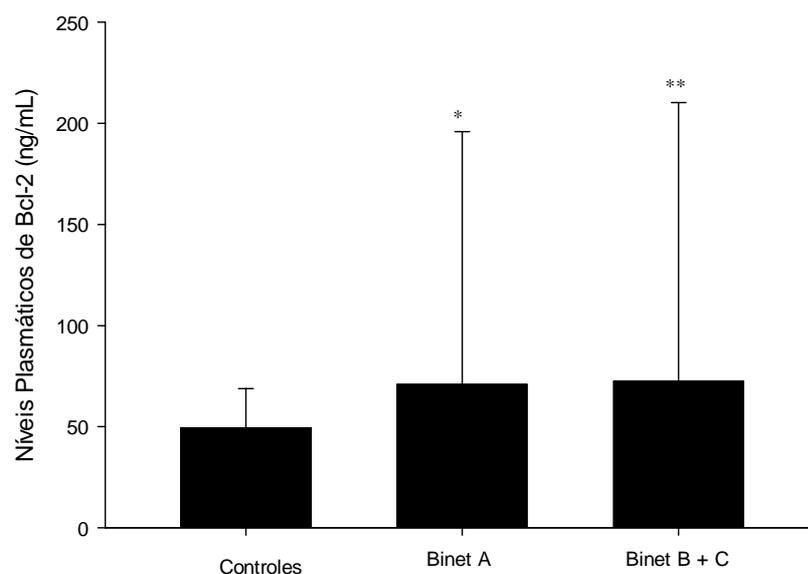


Figura 10 - Concentração de Bcl-2 nos grupos Controle, Binet A e Binet B+C. – Padrão de dispersão

Na análise da expressão da ZAP-70 o valor da mediana foi 0,544 para grupo Binet A, 0,540 para o grupo Binet B+C e 0,310 para o grupo Controle. Corroborando dados prévios do nosso grupo de pesquisa, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos avaliados na comparação entre os grupos Binet A e o grupo Binet B+C e entre o grupo Binet B+C e o grupo Controle (Figura 11).

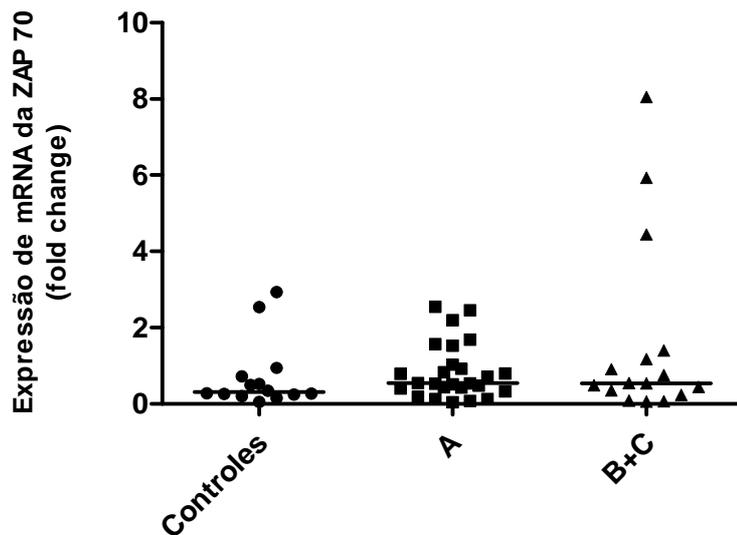


Figura 11 - Expressão de ZAP-70 no grupo Controle, Binet A (A) e Binet B+C (B+C). Barras horizontais representam valores de mediana de ZAP-70.

Na análise da expressão da Ang-2 o valor da mediana foi 0,503 para grupo Binet A, 0,030 para o grupo Binet B+C e 0,290 para o grupo Controle. Diferenças significativas foram observadas ($p < 0,001$) na comparação entre os grupos Binet A e o grupo Binet B+C e entre o grupo Binet B+C e o grupo Controle (Figura 12).

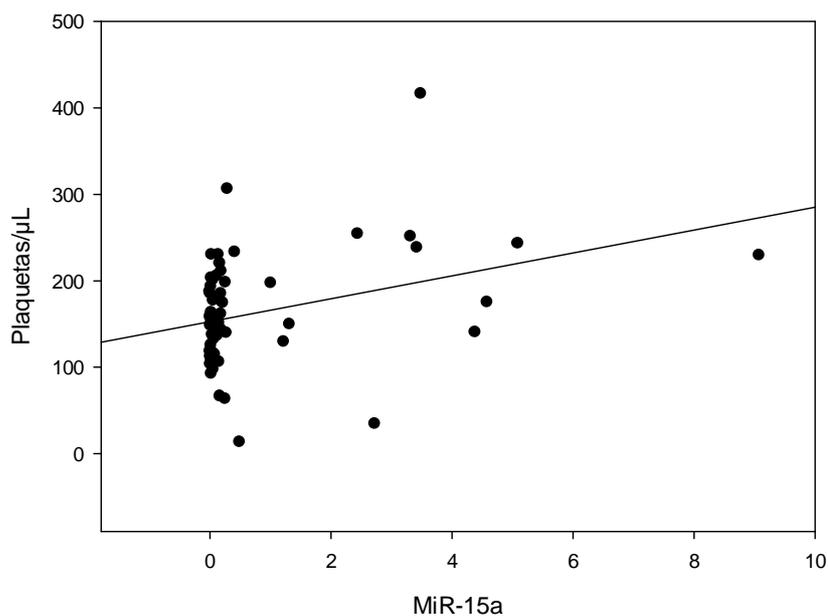


Figura 13 - Correlação entre miR-15a e Plaquetas. ($R^2 = 0.340$; $p=0.009$). Teste de Spearman.

Foi observado correlação negativa entre miR-15a e contagem de linfócitos ($R^2 = 0,376$; $p = 0,004$), e também uma correlação negativa entre miR-16-1 e contagem de linfócitos ($R^2 = 0,515$; $p = 0,00004$) (Figura 14 e 15).

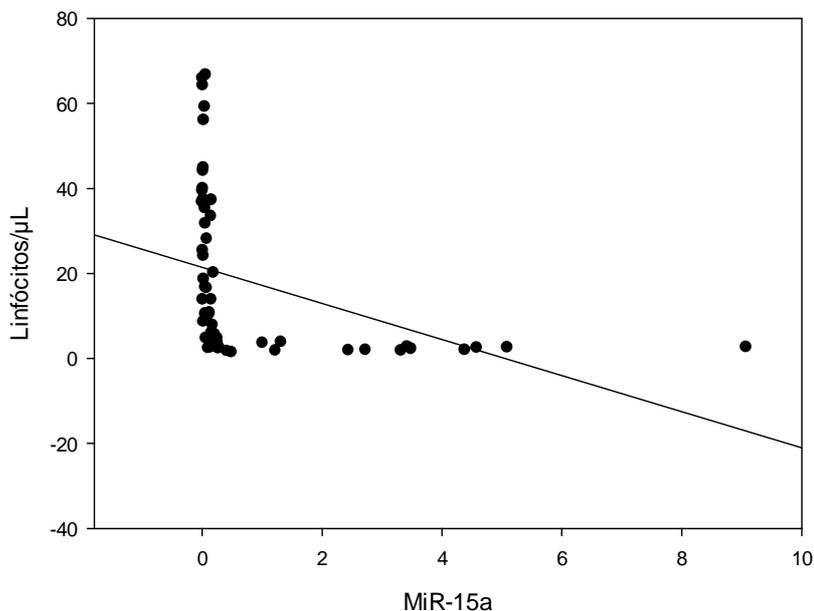


Figura 14 - Correlação entre miR-15a e Linfócitos. ($R^2 = 0.376$; $p=0.004$). Teste de Spearman.

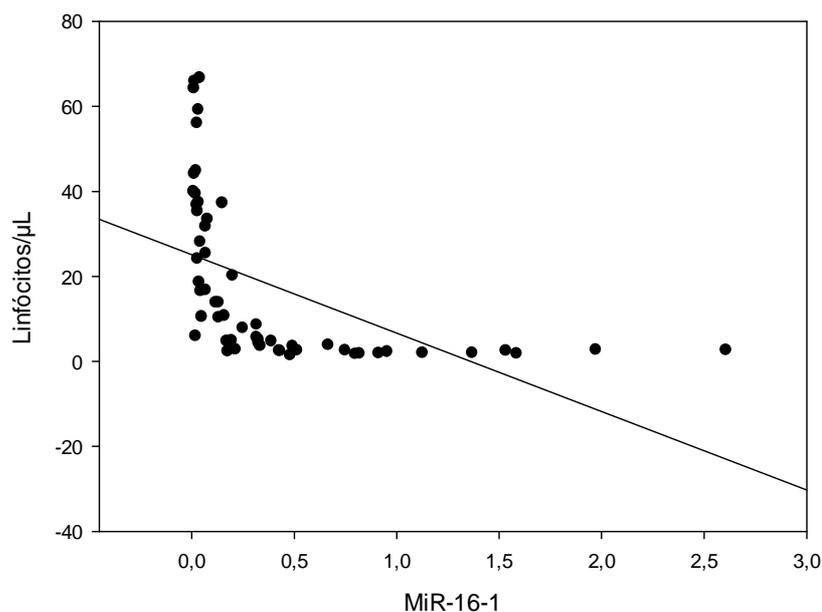


Figura 15 - Correlação entre miR-16-1 e Linfócitos. ($R^2 = 0.515$; $p=0.00004$).
 Teste de Spearman.

Foi observado também uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de Bcl-2 e leucócitos e ($R^2 = 0,310$, $p = 0,019$) (Figura 16).

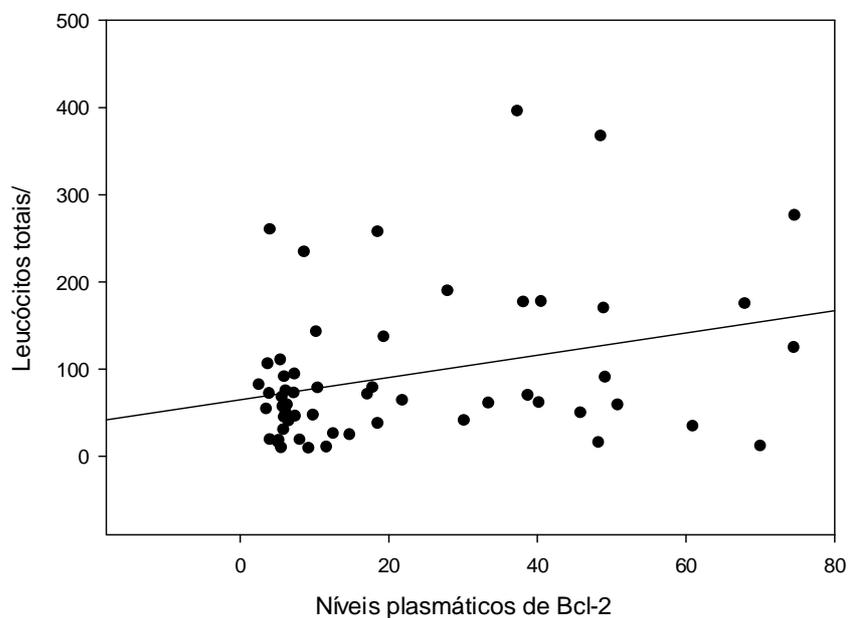


Figura 16 - Correlação entre Bcl-2 e Leucócitos. ($R^2 = 0.310$, $p = 0.019$). Teste de Spearman.

Por outro lado, houve uma correlação negativa entre os resultados de ZAP-70 e contagem de plaquetas ($R^2 = 0,334$; $p = 0,011$) (Figura 17).

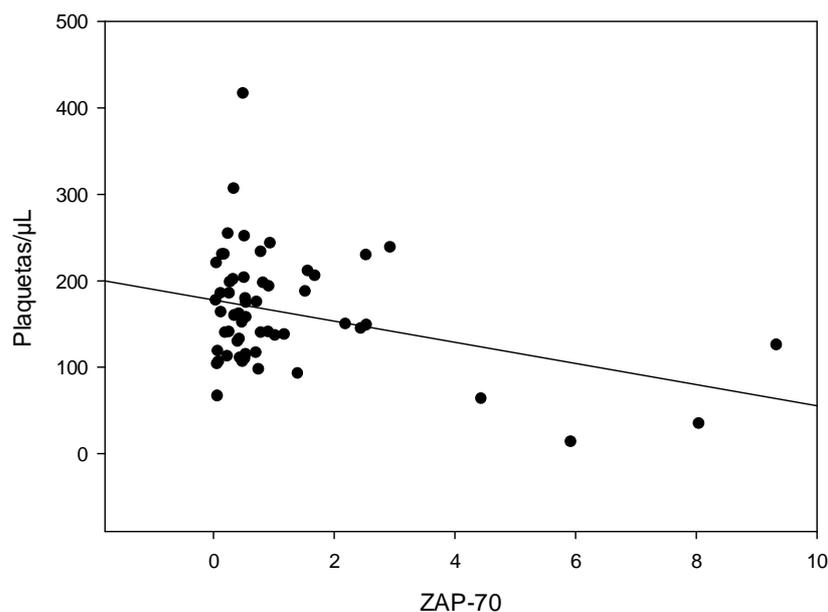


Figura 17 - Correlação entre ZAP-70 e Plaquetas. ($R^2 = 0.334$; $p=0.011$). Teste de Spearman.

Na avaliação da expressão de miR-15a e miR-16-1 *in vitro* após tratamento com fludarabina, foi investigado se haveria interferência do medicamento na expressão destes miRNAs. O valor médio da expressão de miR-15a nas células sem tratamento foi 0,592 e nas células após o tratamento com fludarabina foi 0,570 (Figura 18). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos avaliados ($P = 0,937$).

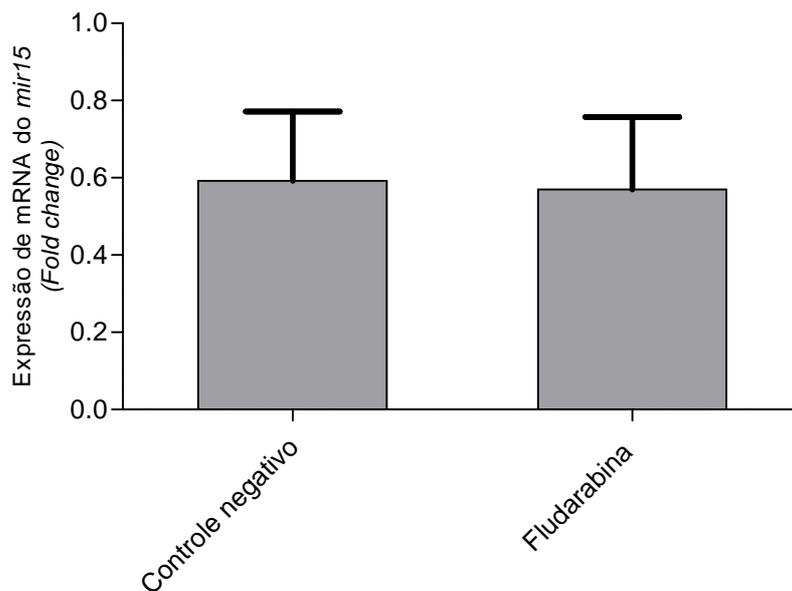


Figura 18 - Avaliação da expressão de miR-15a em cultura de células de pacientes com LLC.

O valor médio da expressão de miR-16-1 nas células sem tratamento foi 0,392 e nas células após o tratamento com fludarabina foi 0,405 (Figura 19). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos avaliados ($P = 1,000$).

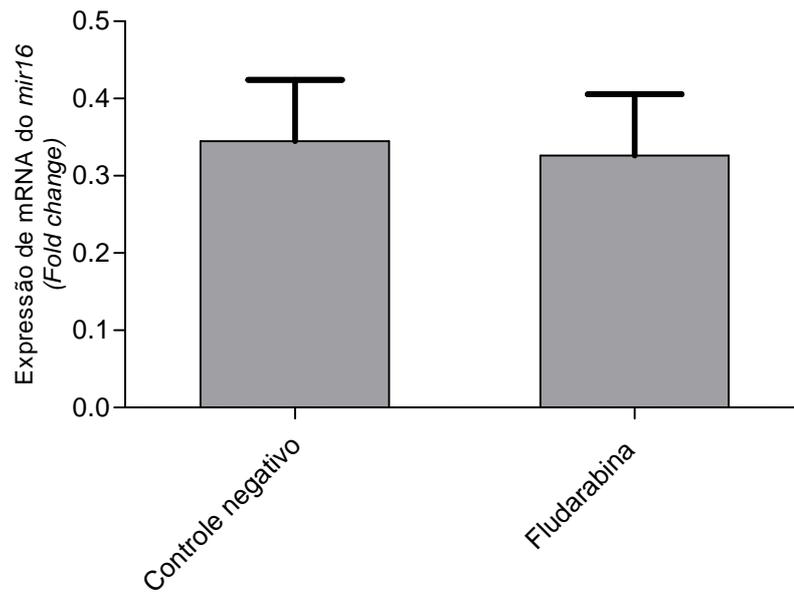


Figura 19 - Avaliação da expressão de miR-16- em cultura de células de pacientes com LLC.

7. DISCUSSÃO

A ocorrência de casos de LLC antes dos 30 anos é muito rara, embora muito comum após a idade de 60 anos, como observado neste estudo, onde apenas 1 paciente tinha menos de 30 anos, 10 pacientes tinham idade entre 50 e 60 anos e os outros 32 pacientes tinham idade superior a 60 anos. Pacientes idosos tendem a desenvolver doença mais agressiva, principalmente devido a co-morbidades já existentes antes do diagnóstico. Quando a evolução dos pacientes é avaliada de acordo com o sexo, além da maior incidência em homens, esses pacientes geralmente apresentam prognóstico menos favorável quando comparados com pacientes do sexo feminino (VASCONCELOS, 2005; YAMAMOTO, 2005; CHEN *et al.*, 2017).

Confirmando os dados da literatura e as características clínicas da doença, neste estudo, foi observado grau diferente de anemia em pacientes de acordo com o estadiamento de Binet. Sabe-se que uma das alterações relacionadas com a instalação de anemia nestes pacientes deve-se ao envolvimento extenso da medula óssea que leva à anemia progressiva em pacientes com LLC, sendo que em 10 a 15% dos pacientes, a anemia é do tipo hemolítica autoimune. Os linfócitos B na LLC geralmente produzem auto-anticorpos, incluindo anticorpos poli-reativos, que em linfócitos normais, são frequentemente observados somente em estágios iniciais de maturação. Esses auto-anticorpos fazem parte da caracterização do fenômeno auto-imune frequentemente observado nesses pacientes, causando anemia e trombocitopenia auto-imune. Aproximadamente 2% dos pacientes apresentam púrpura trombocitopênica imune, que responde positivamente ao tratamento com corticosteroides (BORDIN, 2005; GARICOCHEA, 2005).

Os pacientes estudados apresentaram linfocitose e observou-se que os pacientes com risco moderado à grave apresentaram maior taxa de duplicação de linfócitos quando comparados com pacientes de baixo risco. O tempo de duplicação de linfócitos é caracterizado pela duplicação no número absoluto de linfócitos na contagem sanguínea num período inferior ou igual a doze meses. A presença da duplicação de linfócitos está associada à progressão da doença. No presente estudo, o grupo Binet B+C apresentou maior porcentagem de pacientes com duplicação de linfócitos no período de 12 meses, o que é consistente com características mais agressivas da doença neste grupo, porém nenhuma diferença significativa foi observada quando comparado ao grupo Binet A. Em

pacientes com LLC as células neoplásicas apresentam níveis mensuráveis de multiplicação e morte, sendo a proporção de duplicação ativa dos linfócitos neoplásicos de 0,1% a 1% ao dia. Quando a taxa de proliferação excede 0,5% ao dia a doença apresenta uma evolução mais grave (DEFOICHE *et al.*, 2008; HALLEK, 2008).

Foi observado nos pacientes deste estudo expressão reduzida de miR-15a e miR-16-1. Os genes miR-15a e miR-16-1 atuam como supressores de tumor e são expressos em níveis elevados em linfócitos normais, o que não é observado na LLC, uma vez que apresentam perfil de baixa expressão (CIMMINO *et al.*, 2005; BARTELS; TSONGALIS, 2009; HUMPLIKOVA *et al.*, 2013). No entanto, ao comparar os grupos de pacientes com LLC, o grupo Binet A apresentou menor expressão de miR-15a do que o grupo Binet B+C. Este achado está de acordo com observações anteriores que sugerem que a desintegração de miR-15-1 e miR-16-1 é, de fato, a alteração genética mais frequente dentro de LLC indolente, ou seja, no grupo de pacientes com menor risco (Binet A). Em pacientes com deleções do braço longo do cromossomo 13 (13q14), a perda de expressão de miR-15a/16-1 não só desloca o equilíbrio para níveis aumentados de Bcl-2, proteína anti-apoptótica, mas também para níveis mais elevados de p53, com ação pró-apoptótica. Consequentemente, o número de células apoptóticas diminui devido ao alto nível de Bcl-2, mas o mecanismo da p53 mantém um crescimento de células tumorais relativamente baixo (BALATTI; PEKARKY; CROCE, 2015). Para nossa compreensão, essa explicação é consistente com as correlações observadas entre a expressão de miR-15a/16-1 e a contagem de linfócitos nos pacientes do presente estudo.

Nos pacientes do estudo, os grupos Binet A e Binet B+C apresentaram menor expressão de miR-15a e miR-16-1 e maior concentração plasmática de Bcl-2 quando comparado ao grupo controle, que apresentou maior expressão de miR-15a e MiR-16-1 e menor concentração plasmática de Bcl-2. A correlação positiva também foi encontrada entre Bcl-2 e leucócitos, indicando a inibição do processo de apoptose. A regulação descendente do miR-15a e do miR-16-1 como parte da deleção 13q14 contribui para um aumento na expressão de Bcl-2 (SHAHJAHANI *et al.*, 2015). Os níveis de proteína Bcl-2 são controlados em parte por miR-15a e miR-16-1, portanto, a menor expressão desses microRNAs gera aumento da expressão de Bcl-2. Em pacientes com LLC, o aumento nos

níveis de Bcl-2 leva a uma redução na apoptose e conseqüentemente a uma maior sobrevivência dos linfócitos. Por outro lado, a redução do miR-15a e do miR-16-1 também reduz o crescimento do tumor através da p53. Isso pode explicar como a deleção 13q, região onde o miR-15a e o miR-16-1 estão localizados, está associada à LLC indolente (DEGHEIDY *et al.*, 2013; CALCAGNO *et al.*, 2016; BRAGA *et al.*, 2017).

A proteína ZAP-70 é intracelular e está associada à cadeia zeta do complexo receptor de células T (TCR). A ZAP-70, apesar de não ser encontrada em linfócitos B normais, é expressa em células LLC com gene IgVH não mutado, característica de LLC mais agressiva. Os linfócitos com mutação no gene IgVH, doença menos agressiva, raramente mantêm a expressão desta proteína. Nos dados anteriores do nosso grupo de pesquisa não foi observado diferença na expressão de ZAP-70 que apontam esta proteína como biomarcador na LLC (GOMES *et al.*, 2017), e neste estudo observaram-se resultados similares. Curiosamente, a associação entre esses biomarcadores tem sido amplamente discutida por diferentes grupos de pesquisa. Assim, demonstrou-se que o estado mutacional de IgVH e as anormalidades cromossômicas parecem estar correlacionadas apesar de possuírem parâmetros de relevância prognóstica diferentes. Em relação à sobrevida livre de progressão, a literatura indica que, entre os pacientes não tratados, aqueles com IgVH não mutados apresentam progressão da doença mais rápida. Em pacientes com IgVH não mutada e alta expressão de ZAP-70 (mau prognóstico), os níveis de expressão de miR-15a e miR-16-1 são maiores do que em pacientes com melhor prognóstico (CHAUFFAILLE, 2005; DEL PRINCIPE *et al.*, 2006; CALIN *et al.*, 2008). Esse fato pode explicar como a deleção 13q está associada a LLC indolente ou menos agressiva e, portanto, justifica os níveis mais baixos de expressão de miR-15a no grupo Binet A dos pacientes estudados.

A Ang-2 é produzida por células leucêmicas que induzem angiogênese. Ang-2 ativa células endoteliais que produzem VEGF (fator de crescimento tecidual), aumentando a proliferação e migração de células endoteliais, estimulando o surgimento de novos vasos sanguíneos. Assim, está relacionado aos tumores sólidos e à sua angiogênese, além de estar relacionado a mau prognóstico em pacientes com LLC. A literatura descreve associação

significativa entre expressão de Ang-2 e o estado de IgVH não mutado (MAFFEI *et al.*, 2010; SAGATYS; ZHANG, 2012)

Os pacientes classificados como Binet B ou C geralmente apresentam expressão de Ang-2 maior do que os pacientes Binet A (VRBACKY *et al.*, 2010). No entanto, neste estudo não houve associação entre os níveis de expressão de Ang-2 e a gravidade da doença, já que o grupo de pacientes com baixo risco (Binet A) apresentou uma maior mediana de expressão gênica do que o grupo de pacientes com risco intermediário e alto risco (Binet B + C). Este resultado pode ter ocorrido em decorrência do tratamento realizado pelos pacientes do grupo de alto risco.

Na LLC a quimioterapia é realizada principalmente em pacientes com doença agressiva. Muitos pacientes diagnosticados com LLC não necessitam de tratamento, pois são diagnosticados na fase indolente da doença. Em muitos casos a fludarabina é utilizada no tratamento dos pacientes com doença agressiva. Neste contexto, o presente estudo avaliou se este medicamento poderia estar interferindo na menor expressão de miR-15-1 e miR-16-1 que foi observada no grupo Binet B+C. No entanto, não foi encontrado diferença significativa na expressão de miR-15-1 e miR-16-1 após estudo com células em cultura e tratadas com fludarabina, sugerindo a princípio, que este tratamento não interfere na expressão destes microRNAs.

Os pacientes analisados representam um grupo significativo daqueles que foram encaminhados ao Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com diagnóstico confirmado de Leucemia Linfocítica Crônica. Os dados obtidos auxiliam no maior entendimento da associação dos fatores prognósticos na LLC em nosso meio. Este estudo é o início do processo para identificação de novos biomarcadores de prognóstico, valendo ressaltar, que se um parâmetro é ou não adequado para ser configurado como um biomarcador de prognóstico outros fatores devem ser analisados, como sensibilidade, especificidade, viabilidade e capacidade econômica. Após a identificação da ligação de um parâmetro com a gravidade da doença os estudos irão avançar no intuito da utilização clínica deste marcador buscando alcançar melhores resultados no tratamento do paciente.

A combinação de informações sobre a condição clínica dos pacientes e os dados das células sanguíneas, obtidos na realização do hemograma é

importante no momento do diagnóstico e acompanhamento do paciente. A patogênese da LLC, caracterizada pela replicação clonal de uma célula B, está associada a defeitos intrínsecos e extrínsecos de seu mecanismo apoptótico que influenciam a atividade das células B no microambiente do tecido. Também são observadas anemia e plaquetopenia nos pacientes (GHOSH *et al.*, 2010).

Neste estudo foi observado correlação negativa entre miR-15a e miR-16-1 e a contagem de linfócitos, sendo que quanto menor a expressão destes microRNAs mais pronunciada foi a linfocitose encontrada nos pacientes. Este fato também corrobora a correlação encontrada entre Bcl-2 e a contagem de leucócitos, onde foi observado que quanto maior a expressão de Bcl-2 maior foi a contagem de linfócitos, sugerindo que quanto maior a expressão da proteína anti-apoptótica maior o número dessas células.

Também foi encontrado correlação positiva entre os resultados do miR-15a e as plaquetas, ou seja, quanto menor a expressão de miR-15a menor o número de plaquetas circulantes. Já na avaliação de ZAP-70 e contagem de plaquetas foi encontrado correlação negativa.

O perfil encontrado no grupo dos pacientes estudados contribui de forma significativa para auxiliar no esclarecimento da relação dos eventos regulatórios e o desenvolvimento e evolução das alterações na LLC. Estes dados poderão contribuir futuramente no desenvolvimento de alternativas que leve a melhor prognóstico e escolha de terapêutica eficaz para os pacientes com LLC.

8. CONCLUSÃO

Os microRNAs miR-15a e miR-16-1 parecem ser marcadores promissores para avaliar pacientes que apresentam LLC indolente, uma vez que a expressão foi mais reduzida no grupo Binet A, grupo de menor risco como um todo.

Os altos níveis de Bcl-2, proteína anti-apoptótica, observados nos pacientes, corroboram o mecanismo de inibição da apoptose em pacientes com LLC, o que contribui para a linfocitose presente nesta doença.

Não foi encontrada diferença na expressão de ZAP-70 entre os grupos analisados, sugerindo a não utilidade desta proteína como biomarcador molecular na LLC.

Os níveis de expressão de Ang-2 não mostraram correlação com a gravidade da doença. Por outro lado, correlações foram observadas entre microRNAs, Bcl-2 e parâmetros hematológicos convencionais indicativos de gravidade da LLC.

O tratamento com fludarabina não interferiu na expressão de miR-15a e miR-16-1 em células de LLC *in vitro*.

Em suma, os dados analisados em conjunto permitem concluir que os marcadores microRNAs miR-15a e miR-16-1, além de Bcl-2, estão associados ao desequilíbrio no processo de apoptose, fato que acarretaria acúmulo de linfócitos e agravamento da doença.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIAR, B. et al. MicroRNAs – Biogênese , funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. **Odontol. Clin.-Cient.**, v. 9, n. 2, p. 105–109, 2010.
2. BALATTI, V.; PEKARKY, Y.; CROCE, C. M. Role of microRNA in chronic lymphocytic leukemia onset and progression. **Journal of hematology & oncology**, v. 8, n. 1, p. 12, 2015.
3. BARTELS, C. L.; TSONGALIS, G. J. Mini-reviews micromas: novel biomarkers for human cancer. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 623–631, 2009.
4. BORDIN, J. O. Anemia hemolítica auto-imune e outras manifestações imunes da leucemia linfocítica crônica. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 27, n. 4, p. 257–262, 2005.
5. BRAGA, T. V. et al. Evaluation of MiR-15a and MiR-16-1 as prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 864–869, ago. 2017.
6. CALCAGNO, C. et al. The Prognostic Difference of Monoallelic Versus Biallelic Deletion of 13q in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cancer**, v. 28, n. 10, p. 1304–1314, 2016.
7. CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15524–9, 2002.
8. CALIN, G. A. et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 32, p. 11755–11760, 2004.
9. CALIN, G. A. et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 17, p. 1793–1801, 2005.
10. CALIN, G. A. et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 13, p. 5166–71, 2008.
11. CHAUFFAILLE, M. Cytogenetics and molecular biology in chronic

- lymphocytic leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 4, p. 247–252, 2005.
12. CHEN, C.-Z. et al. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. **Science**, v. 303, n. 5654, 2004.
 13. CHEN, Y.-F. et al. The roles of reactive oxygen species (ROS) and autophagy in the survival and death of leukemia cells. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 112, p. 21–30, 2017.
 14. CIMMINO, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 39, p. 13944–13949, 2005.
 15. CORTEZ, M. A. et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 8, p. 467–477, 2012.
 16. CORY, S.; ADAMS, J. M. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647–656, set. 2002.
 17. DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205–219, 2004.
 18. DANILOV, A. et al. Molecular Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 665–675, 1 set. 2006.
 19. DE FARIA, J. R. et al. Prognosis related to staging systems for chronic lymphocytic leukemia. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 118, n. 4, p. 83–8, 6 jul. 2000.
 20. DEFOICHE, J. et al. Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 143, n. 2, p. 240–247, 2008.
 21. DEGHEIDY, H. A. et al. Bcl-2 level as a biomarker for 13q14 deletion in CLL. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 84B, n. 4, p. 237–247, jul. 2013.
 22. DEL PRINCIPE, M. I. et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 853–861, 2006.
 23. DIGHIERO, G. CLL biology and prognosis. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 278–284, 2005.
 24. DOENCH, J. G.; SHARP, P. A. Specificity of microRNA target selection in

- translational repression. **Genes**, v. 504, n. 5, p. 504–511, 2004.
25. FALCÃO, R. P. Leucemia linfóide crônica: nova visão de uma velha doença (II Encontro Brasileiro de Consenso. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 27, n. 4, p. 227–228, 2005.
26. FLEITAS, T. et al. VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 15, n. 11, p. 897–902, 5 nov. 2013.
27. FURTADO, F. M. et al. Telomere length analysis in monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia Binet A. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 5, p. 1–4, 2017.
28. GARICOCHEA, B. Patogênese da leucemia linfóide crônica. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 27, n. 4, p. 241–46, 2005.
29. GHOSH, A. K. et al. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. **Blood**, v. 115, n. 9, p. 1755–64, 4 mar. 2010.
30. GOMES, L. C. et al. Prognosis biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, n. February, p. 57–62, 2017.
31. GONÇALVES, R. P. et al. Avaliação do perfil hematológico de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC-B) em um hemocentro estadual. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 228–234, 2009.
32. GONZALEZ, D. et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: Results from the LRF CLL4 trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 16, p. 2223–2229, 2011.
33. HALLEK, M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. **Annals of Oncology**, v. 19, n. SUPPL. 4, p. 51–53, 2008.
34. HUANG, L. et al. Expression feature of CD3, FcεR1γ, and Zap-70 in patients with chronic lymphocytic leukemia. **Hematology**, v. 17, n. 2, p. 71–75, 18 mar. 2012.
35. HUMPLIKOVA, L. et al. Expression of miR-15a and miR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia. **Biomedical Papers**, v. 157, n. 4, p. 284–293, 2013.

36. HÜTTMANN, A. et al. Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukaemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. **Leukemia**, v. 20, n. 10, p. 1774–1782, 17 out. 2006.
37. KAZANDJIAN, D.; LANDGREN, O. A look backward and forward in the regulatory and treatment history of multiple myeloma: Approval of novel-novel agents, new drug development, and longer patient survival. **Seminars in Oncology**, v. 43, n. 6, p. 682–689, dez. 2016.
38. KIKUSHIGE, Y. et al. Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 20, n. 2, p. 246–259, 2011.
39. KLEIN, U. et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 28–40, 2010.
40. KÖHNKE, T., WITTMANN, V. K., BÜCKLEIN, V. L., LICHTENEGGER, F., PASALIC, Z., HIDDEMANN, W., SPIEKERMANN, K., SUBKLEWE, M. Diagnosis of CLL revisited: increased specificity by a modified five-marker scoring system including CD200. **Br J Haematol.** v. 179(3), p. 480-487, 2017.
41. LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.
42. LONGO, P. G. et al. The Akt / Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells The Akt / Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the. **Survival**, v. 111, n. 2, p. 846–855, 2008.
43. LORAND-METZE, I. LLC : Critérios diagnósticos , imunofenotipagem e diagnóstico diferencial CLL : Diagnostic criteria , immunophenotyping and differential diagnosis. **Blood**, v. 27, n. 4, p. 233–235, 2005.
44. MACHADO, R. P. G. **Perfil clínico dos pacientes com LLC-B do Ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio/Hemoce : correlação com marcadores biológicos de prognóstico.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2009.

45. MAFFEI, R. et al. Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 584–592, 2010.
46. MICHAEL, M. Z. et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. **Molecular cancer research : MCR**, v. 1, n. 12, p. 882–891, 2003.
47. MOREAU, E. J., MATUTES, E., A'HERN, R. P., MORILLA, A. M., MORILLA, R. M., OWUSU-ANKOMAH, K. A. et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). **Am J Clin Pathol** v. 108, p. 378-382, 1997.
48. PACKHAM, G.; STEVENSON, F. K. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. **Immunology**, v. 114, n. 4, p. 441–449, 2005.
49. PEKARSKY, Y.; CROCE, C. M. Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL? **Oncotarget**, v. 1, p. 224–227, 2010.
50. RICARTE FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102–1107, 2006.
51. ROBERTS, A. W. et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 4, p. 311–322, 2016.
52. RODRIGUES, C. A. et al. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 4, p. 346–357, 2016.
53. ROWSWELL-TURNER, R. B. et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia in older adults. **Journal of Geriatric Oncology**, v. 34, n. 0, p. 1104–1111, 6 maio 2017.
54. SAGATYS, E. M.; ZHANG, L. Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. **Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 19, n. 1, p. 18–25, jan. 2012.
55. SCARFÒ, L.; FERRERI, A. J. M.; GHIA, P. Chronic lymphocytic leukaemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 104, p. 169–

- 182, 2016.
56. SHAHJAHANI, M. et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. **Cellular Oncology**, v. 38, n. 2, p. 93–109, 7 abr. 2015.
57. SRIVASTAVA, S.; TSONGALIS, G. J.; KAUR, P. Recent advances in microRNA-mediated gene regulation in chronic lymphocytic leukemia. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 10–11, p. 901–908, 2013.
58. STAMATOPOULOS, B.; VAN DAMME, M. Opposite Prognostic Significance of Cellular and Serum Circulating MicroRNA-150 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. **Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 1, 2015.
59. SWERDLOW, S.H., CAMPO, E., HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., PILERI, S.A., STEIN, H., THIELE, J., VARDIMAN, J. . **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition - WHO - OMS -** Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4002>>. Acesso em: 3 abr. 2017.
60. VASCONCELOS, Y. Marcadores de prognóstico na leucemia linfocítica crônica Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. v. 27, n. 4, p. 253–256, 2005.
61. VRBACKY, F. et al. Angiopoietin-2 mRNA expression is increased in chronic lymphocytic leukemia patients with poor prognostic features. **Hematology**, v. 15, n. 4, p. 210–214, 18 ago. 2010.
62. VYAS, N.; HASSAN, A. Recent advances in chronic lymphocytic leukemia. **Indian journal of cancer**, v. 49, n. 1, p. 137–43, 2012.
63. WILLIAM, J. et al. Evolution of Autoantibody Responses via Somatic Hypermutation Outside of Germinal Centers. **Science**, v. 297, n. 5589, 2002.
64. World Medical Association Declaration of Helsinki. **JAMA**, v. 310, n. 20, p. 2191, 27 nov. 2013.
65. XIA, Y. et al. Angiogenic factors in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia research**, v. 36, n. 10, p. 1211–7, 1 out. 2012.
66. YAMAMOTO, M. ZAP-70: Aspectos práticos. v. 27, n. 4, p. 236–240, 2005.

67. YU, L. et al. Survival of Del17p CLL Depends on Genomic Complexity and Somatic Mutation. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, n. 21, p. clincanres.0594.2016, 2016.
68. ZANETTE, D. L. et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 40, n. 11, p. 1435–40, 2007.
69. ZHANG, Z. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. **PloS one**, v. 7, p. e46495, jan. 2012.

10. ANEXOS

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfoides e mielodisplasia”

SUBPROJETO: “Leucemia Linfocítica Crônica: avaliação de fatores de diagnóstico e prognósticos e sua relação com o estadiamento da doença”

Prezado (a) Senhor (a),

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

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

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

Nome:

Documento de identificação:

Assinatura: _____ **Data:** ____ / ____ / ____

Anexo 2

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de junho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na Leucemia Linfocítica Crônica(LLC)" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

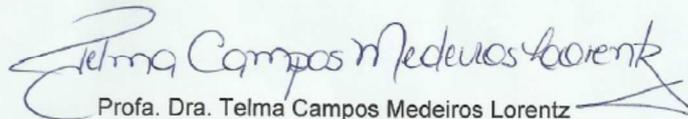
Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 22 de abril de 2015, a emenda ao projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na LeucemiaLinfocítica Crônica(LLC)**" com as alterações:

- Inclusão de pacientes com Síndrome Mielodisplásica e Leucemias Mielóides e Linfóides;
- Substituir o título corrente por: "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfóides e mielodisplasia";
- Substituir: "estudar in vitro o efeito de diferentes quimioterápicos" por estudar in vitro o efeito de biomoléculas, uma vez que quimioterápicos são usados para comparação de feito de novas biomoléculas pelo grupo de estudo;
- Alteração do tempo de execução do projeto, com extensão do prazo para 2020.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG