

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

**LORENA CAIXETA GOMES**

**LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA: AVALIAÇÃO DA  
EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA QUINASE AKT, DE  
MICRORNAS E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-4  
RELACIONADOS COM A PATOGÊNESE DA DOENÇA**

**BELO HORIZONTE**

**2019**

**LORENA CAIXETA GOMES**

**LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA: AVALIAÇÃO DA  
EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA QUINASE AKT, DE  
MICRORNAS E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-4  
RELACIONADOS COM A PATOGÊNESE 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 à obtenção do grau de Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino

Coorientadora: Prof. Dra. Maria das Graças Carvalho

**BELO HORIZONTE**

**2019**

G633I Gomes, Lorena Caixeta.  
Leucemia linfocítica crônica: avaliação da expressão gênica da proteína quinase AKT, de microRNAs e dos níveis plasmáticos de IL-4 relacionados com a patogênese da doença / Lorena Caixeta Gomes. – 2019.  
104 f. : il.

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

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

1. Leucemia linfocítica crônica. 2. MicroRNAs. 3. Apoptose – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. 5. Leucemia – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Carvalho, Maria das Graças. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.99419



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

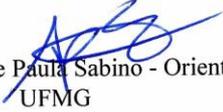
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA QUINASE AKT, DE MICRORNAS E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-4 RELACIONADOS COM A PATOGÊNESE DA DOENÇA**

**LORENA CAIXETA GOMES**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

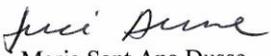
Aprovada em 17 de dezembro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

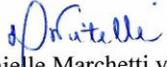
  
Prof. Adriano de Paula Sabino - Orientador  
UFMG

  
Prof. Maria das Graças Carvalho  
UFMG

  
Prof. Leonardo de Souza Vasconcelos  
UFMG

  
Prof. Ana Paula Lucas Mota  
UFMG

  
Prof. Luci Maria Sant Ana Dusse  
UFMG

  
Prof. Danielle Marchetti vitelli Avelar  
Clínica Hematológica

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2018.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente à Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos de doutorado, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer;
- Ao meu orientador Adriano de Paula Sabino, por não medir esforços para que o trabalho acontecesse da melhor forma possível, pela confiança, pelas oportunidades e pelo suporte de sempre;
- À minha coorientadora Maria das Graças Carvalho, pelo incentivo, disponibilidade, carinho e pelos valiosos ensinamentos;
- À professora Ana Paula Mota, pelo auxílio importante na técnica de ELISA e pelas oportunidades de crescimento;
- Ao professor Rodrigo Ribeiro Resende e seu aluno Ricardo Parreira, pela colaboração importante e pelo auxílio nas técnicas utilizadas para os microRNAs;
- À Professora Edna Afonso Reis, do Departamento de Estatística do ICEX da UFMG, pelo auxílio nas análises estatísticas;
- Aos pacientes e indivíduos do grupo controle, aos médicos e funcionários do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais que possibilitaram e colaboraram para que esse trabalho acontecesse.
- Aos meus pais, Valder e Roseane, pelo amor, apoio incondicional, por serem meus exemplos, por me fortalecerem e me incentivarem nas horas difíceis, de desânimo e de cansaço.

- Aos meus irmãos, Mariana e Arthur, pelos momentos de descontração e por entenderem, nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente;

- Ao meu marido Alessandro, por compreender minha ausência, tolerar meus humores, pelo sorriso diário e pelo amor que me sustentam a cada dia para alcançar meus objetivos;

- À minha família que mesmo distante vibra com cada conquista minha;

- Aos meus amigos do Laboratório de Hematologia, que me suportaram nas dificuldades, me deram forças e que continuarão presentes em minha vida com certeza, em especial à Rita e à Flávia.

- Ao Clube dos Oficiais da Polícia Militar de Minas Gerais e à professora Cláudia Ferreira e suas alunas, pela oportunidade de coleta do grupo controle, essencial para que esse trabalho se concretizasse;

- Ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas (PPGACT) por todo apoio e suporte;

- Ao CNPq, CAPES, PRPq-UFMG e PRPG-UFMG pelo auxílio financeiro;

- Aos meus amigos e a todos que de forma direta ou indireta fizeram parte dessa conquista, o meu sincero agradecimento.

## RESUMO

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é reconhecida pela evolução clínica heterogênea e que não pode ser prevista com exatidão pelos sistemas de estadiamento clínico. Isto leva à investigação de marcadores de prognóstico que podem agregar valor preditivo aos sistemas de estadiamento. O presente estudo teve como objetivo avaliar marcadores com potencial prognóstico com foco na expressão da proteína quinase AKT e de microRNAs (miRNAs ou miRs) e na quantificação dos níveis plasmáticos de IL-4, em pacientes com LLC comparados aos indivíduos controles. Foram avaliados 80 pacientes diagnosticados com LLC no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Como grupo controle, foram também igualmente avaliados 75 indivíduos, aparentemente hígidos e sem história pregressa de leucemia. A expressão gênica da AKT e dos microRNAs foi avaliada por PCR quantitativa (qPCR) e a determinação dos níveis plasmáticos de IL-4 pelo imunoenensaio ELISA. Houve um aumento significativo da expressão gênica de AKT nos pacientes quando comparados aos controles ( $p=0,017$ ). Quando os pacientes foram estratificados segundo os grupos de Binet, foi observada diferença significativa entre os grupos, estando esta proteína quinase mais expressa no grupo B+C ( $p=0,013$ ). Quanto à expressão dos miRNAs, o miR-let-7b e o miR-26a se mostraram reduzidos nos pacientes com LLC. Todavia, não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica destes microRNAs quando comparados os pacientes entre os grupos de Binet (A *versus* B+C). A IL-4 apresentou concentração plasmática mais elevada nos controles quando comparada aos pacientes ( $p<0,001$ ) e não houve diferenças significativas quando comparados os grupos de Binet. A redução da IL-4 nos pacientes pode ser atribuída, em parte, à redução de linfócitos T nesses pacientes. A proteína quinase AKT está envolvida na cascata de sinalização que ocorre com a ativação do receptor BCR que leva à maior sobrevivência dos linfócitos na LLC e proteção contra o processo de indução da morte celular. O aumento da proteína quinase AKT e a redução dos miR-let-7b e miR-26a, ambos supressores de tumor, nos pacientes com LLC podem

explicar o aumento da sobrevivência dos linfócitos nesses pacientes e poderiam ser utilizados como biomarcadores de pior prognóstico.

Palavras-chave: Leucemia linfocítica crônica. MicroRNAs. Interleucina 4. Apoptose. Proteína quinase B.

## ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is recognized by heterogeneous clinical course and can not be accurately predicted by clinical staging systems. This leads to the investigation of prognostic markers that can add predictive value to staging systems. The present study aimed to evaluate markers with prognosis potential focusing on AKT protein kinase and microRNAs (miRNAs ou miRs) expression and on quantification of IL-4 plasma levels in patients with CLL compared to controls. We evaluated 80 patients diagnosed with CLL at the Hematology Service of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais. As a control group, 75 individuals, apparently healthy and without previous history of leukemia, were also evaluated. The AKT and microRNAs gene expression were assessed by quantitative PCR (qPCR) and IL-4 plasma levels determination by the ELISA immunoassay. There was a significant increase in AKT gene expression in patients when compared to the controls ( $p=0,017$ ). When the patients were stratified according to the Binet groups, a significant difference was observed between the groups, being this protein kinase most expressed in the B+C group ( $p=0,013$ ). As for miRNA expression, miR-let-7b and miR-26a were reduced in CLL patients. However, no significant differences were observed in these microRNAs gene expression when comparing the patients between the Binet (A *versus* B+C) groups. IL-4 had a higher plasma concentration in controls when compared to patients ( $p<0,001$ ) and there were no significant differences when comparing the Binet groups. The reduction of IL-4 in patients can be attributed, in part, to the reduction of T lymphocytes in these patients. The AKT protein kinase is involved in the signaling cascade that occurs with activation of BCR receptor that leads to increased survival of lymphocytes in CLL and protection against the process of cell death induction. Increased AKT protein kinase and the reduction of miR-let-7b and miR-26a, both tumor suppressors, in CLL patients may explain increased lymphocyte survival in these patients and could be used as poor prognostic biomarkers.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia. MicroRNAs. Interleukin 4. Apoptosis. Protein kinase B.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vias de sinalização ativadas pela estimulação do receptor BCR.....	26
Figura 2 - Síntese do microRNA e mecanismo de inibição da tradução do mRNA (Adaptado de Cuellar e MacManus, 2005) .....	28
Figura 3 - Ativação do linfócito T pela célula apresentadora de antígenos com posterior liberação de IL-4 levando à proliferação de linfócitos B e T CD4+ .....	31
Figura 4 - Curva melt da AKT com Tm em torno de 89°C e do GAPDH com Tm em torno de 83°C .....	41
Figura 5 - Curva melt dos microRNAs com Tm em torno de 75°C e U6 com Tm em torno de 81°C .....	41
Fluxograma 1 - Seleção dos pacientes e indivíduos controles.....	35
Fluxograma 2 - Métodos .....	38
Gráfico 1 - Expressão gênica da AKT no grupo Binet A, Binet B+C e grupo controle .....	47
Gráfico 2 - Mediana dos valores da expressão gênica de cada miRNA de acordo com o grupo dos pacientes com LLC e controles.....	49
Gráfico 3 - Mediana dos valores da expressão gênica de cada miRNA de acordo com o grupo de Binet, A ou B+C e controles .....	50
Gráfico 4 - Representação dos níveis plasmáticos de IL-4 dos pacientes com LLC <i>versus</i> controles.....	52
Quadro 1 - Estadiamento da leucemia linfocítica crônica.....	21
Quadro 2 - Sistema de pontuação para diagnóstico de LLC .....	24

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos pacientes com LLC e indivíduos do grupo controle em relação ao sexo, média de idade e faixa etária .....	44
Tabela 2 - Caracterização dos pacientes em relação aos controles quanto aos dados do hemograma .....	45
Tabela 3 - Caracterização dos pacientes em relação à classificação de Binet e dados do hemograma .....	45
Tabela 4 - Expressão gênica de AKT em relação à classificação de Binet.....	47
Tabela 5 - Expressão gênica dos microRNAs nos pacientes com LLC e controles.....	49
Tabela 6 - Níveis plasmáticos de IL-4 .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS: ácido acetilsalicílico

Ag: Antígeno

AGO: argonauta

AKT: proteína quinase B

AMO: oligonucleotídeos anti-microRNA

APC: célula apresentadora de antígenos

ASOs: oligonucleotídeos anti-sentido

BCR: receptor da célula B

BLNK: proteína ligadora de célula B

BTK: Bruton tirosina quinase

CD: *cluster differentiation*, grupo de diferenciação

cDNA: DNA complementar

CDODA-Me: Methyl 2-cyano-3,11-dioxo-18 $\beta$ -olean-1,12-dien-30-oate

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMT: transição de epitélio-mesenquimal

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

Hb: hemoglobina

HRP: enzima peroxidase

IFN-  $\gamma$ : interferon  $\gamma$

IgVH: cadeia pesada da imunoglobulina

IKK: inibidor de  $\kappa$ B quinase

IL: interleucina

JNK: c-JUN quinase

k-ras: *Kirsten ras oncogene*

LDT: tempo de duplicação de linfócitos

LLC: leucemia linfocítica crônica

LNAs: bloqueador de ácidos nucleicos

LYN: tirosina quinase da família Src

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MAVS: *Mitochondrial antiviral-signaling protein*

miRNA ou miR: microRNA  
mRNA: RNA mensageiro  
mTOR: *mammalian target of rapamycin*  
MYCBP: proteína ligante de MYC  
NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B  
NFAT: fator nuclear ativado por células T  
NK: *natural killer*  
OD: densidades ópticas  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
ORF: quadro de leitura aberto  
PBS: tampão fosfato salino  
PI3k: fosfatidilinositol 3-quinase  
PIK3IP1: *phosphatidylinositol 3'kinase interacting protein 1*  
PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato  
PIP3: fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato  
PKC: proteína quinase C  
PLCy2: fosfolipase Cy2  
PRKRA/PACT: *interferon-inducible double stranded RNA-dependent activator*  
PTEN: *phosphatase and tensin homolog*  
qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa  
RISC: *RNA-induced silence complex*  
sIgM: igM de superfície  
Slg: imunoglobulina de superfície  
SP1: proteína de especificidade 1  
SYK: tirosina quinase do baço  
TCR: receptor de célula T  
TLR: receptor tipo Toll  
T<sub>m</sub>: temperatura de *melting*  
TMB: 3, 3', 3, 5' –tetrametilbenzidina  
TNF: fator de necrose tumoral  
TRBP: *trans-activation response RNA-binding protein*  
ULK1: *Unc-51 like autophagy activating kinase 1*  
VDAC1: *voltage-dependent anion channel 1*  
ZAP-70: proteína associada à cadeia zeta do receptor de célula T de 70 kD

ZBTB10: BTB contendo domínio 10

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Leucemia Linfocítica Crônica.....	20
2.2 Proteína quinase B: AKT .....	25
2.3 microRNAs.....	27
2.4 Interleucina-4 (IL-4) .....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral .....	33
3.2 Objetivos específicos .....	33
4. PACIENTES E MÉTODOS .....	34
4.1 Casuística .....	34
4.1.1 Critérios de inclusão .....	36
4.1.2 Critérios de exclusão .....	36
4.1.3 Amostra biológica .....	36
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Hemograma .....	38
4.2.2 Extração do RNA.....	38
4.2.3 Quantificação do RNA .....	39
4.2.4 Confeção do cDNA .....	39
4.2.5 PCR em tempo real .....	40
4.2.6 Determinação dos níveis plasmáticos da IL-4 .....	41
4.2.7 Análise estatística .....	43
5. RESULTADOS .....	44
5.1 Caracterização dos pacientes e controles.....	44
5.2 Expressão gênica da proteína quinase AKT.....	46

5.3 Expressão gênica dos microRNAs .....	48
5.4 Concentração plasmática de IL-4 .....	50
6. DISCUSSÃO.....	53
6.1 Caracterização dos pacientes .....	53
6.2 Aumento da expressão gênica da Proteína quinase AKT nos pacientes com LLC .....	53
6.3 MicroRNAs.....	57
6.3.1 Redução da expressão gênica do miR-let-7b nos pacientes com LLC .....	58
6.3.2 Redução da expressão gênica do miR-26a nos pacientes com LLC.....	61
6.3.3 Expressão gênica inalterada do miR-21 nos pacientes com LLC.....	63
6.3.4 Expressão gênica inalterada do miR-27a nos pacientes com LLC.....	65
6.4 Avaliação dos níveis plasmáticos de Interleucina-4 .....	68
6.5 Considerações finais e limitações do estudo.....	71
7. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS .....	74
ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP).....	92
ANEXO II – Ficha Clínica dos Pacientes .....	93
ANEXO III- Termo de Consentimento livre e esclarecido dos pacientes	94
ANEXO IV- Termo de Consentimento livre e esclarecido dos controles	95
ANEXO V – Artigos publicados.....	96
APÊNDICE I – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com LLC..	95
ANEXO VI- Apresentações em congressos.....	100
ANEXO VII - Experiência no exterior .....	102

## 1. INTRODUÇÃO

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é reconhecida pela evolução clínica heterogênea e que não pode ser prevista com exatidão pelos sistemas de estadiamento clínico. Isto motivou a investigação de marcadores de prognóstico que podem agregar valor preditivo aos sistemas de estadiamento. Entre os marcadores clínicos e biológicos sugeridos na literatura, as alterações cromossômicas, a proteína tirosino quinase ZAP-70, a presença do CD38 e o estado mutacional dos genes de imunoglobulinas se mostram promissores na avaliação de prognóstico na LLC. No entanto, as técnicas empregadas para a detecção destes marcadores são trabalhosas e inacessíveis à maioria dos serviços de oncohematologia, o que tem motivado a busca por marcadores substitutos.

Níveis elevados de expressão da proteína quinase AKT nos linfócitos B da LLC estão associados ao prognóstico desfavorável, o que parece estar relacionado com um maior estado de ativação celular. Alterações nas vias de sinalização celular contribuem não só para o desenvolvimento tumoral, mas também para resistência ao tratamento convencional. Dessa forma, é importante compreender o papel da AKT na patogênese e progressão da LLC, a fim de elaborar estratégias para explorá-la terapêuticamente.

Alterações nos microRNAs (miRNAs ou miRs) vem sendo estudadas em muitos tumores. A capacidade dos miRNAs de modular a expressão gênica é essencial para proporcionar controle de vários processos celulares e, por isso, qualquer desequilíbrio pode levar ao desenvolvimento e progressão de várias doenças, como a LLC. A desregulação de miRNAs pode afetar o ciclo celular, a proliferação e principalmente as vias de apoptose dos linfócitos B leucêmicos. Existem muitos miRNAs que ainda não foram relacionados à LLC, além de muitos com mecanismo de ação desconhecido. Assim, estudos adicionais envolvendo miRNAs com potencial envolvimento com esta doença são desejáveis.

Estudos recentes vêm correlacionando o aumento da interleucina-4 (IL-4) com a progressão da LLC e a longevidade dos linfócitos B leucêmicos. No

entanto, também são necessários novos estudos para melhor compreensão do mecanismo de ação da IL-4 e de seu envolvimento com os miRNAs e com a ativação das vias de sinalização na LLC.

A importância deste estudo reside na busca de maior conhecimento acerca do perfil de expressão do mRNA da proteína quinase AKT e miRNAs por meio da técnica quantitativa de PCR em tempo real, e dos níveis plasmáticos de IL-4 por ELISA, em pacientes com LLC comparados aos controles. Os achados deste estudo serão correlacionados aos estágios da doença segundo Binet e dados laboratoriais. Acredita-se que os resultados ajudarão a compreender melhor a relação dos eventos regulatórios e o desenvolvimento das alterações neoplásicas hematológicas em pacientes selecionados em nosso meio.

Cabe ressaltar que a investigação de alguns microRNAs no contexto da LLC é inédita. Como exemplo, o miR-let-7b, miR-26a e o miR-27a não foram ainda encontrados associados com a LLC ou mesmo com doenças hematológicas, considerando a revisão sistemática qualitativa incluindo artigos publicados nas bases de dados e bibliotecas *online*.

Diante do exposto, a hipótese do presente estudo admite que a expressão do RNA mensageiro (mRNA) da proteína quinase AKT e miRNAs, e os níveis de IL-4, podem estar relacionados a maior agressividade e progressão da doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leucemia Linfocítica Crônica

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no sangue periférico, medula óssea e órgãos linfoides sólidos, embora alguns casos de leucemia linfocítica T possam ocorrer. É uma doença com maior prevalência em idosos com idade média de 64-70 anos (GONÇALVES *et al.*, 2009). A LLC representa 30% dos casos de leucemia na Europa e América do Norte com uma incidência de 3-5 casos a cada 100.000 habitantes (ROBAK, 2013). A LLC é originária de uma população de células B CD5 +. Essas células são reconhecidas pela sua grande longevidade, na maioria dos casos, adquirida pela inibição da apoptose e aumento da expressão de proteínas da família bcl-2 (DIGHIERO, 2005; WILLIMOTT *et al.*, 2013). Os pacientes podem ter a forma indolente ou agressiva da doença que afetam a evolução clínica, o tempo de proliferação celular e a capacidade de resposta ao tratamento. A LLC na fase indolente evolui devagar, ocasionalmente não progride para a manifestação grave e não requer tratamento. Em contraste, a fase agressiva evolui rapidamente e pode levar à morte em pouco tempo (RODRÍGUEZ-VICENTE; DÍAZ; HERNANDEZ-RIVAS, 2013; PALOMBA, 2014).

Os sistemas clássicos de estadiamento da doença, Rai e Binet, são baseados em características clínicas e hematológicas (Quadro 1). Contudo, em estágios iniciais da LLC, nenhum dos dois sistemas distingue com precisão os pacientes que podem desenvolver a forma mais agressiva da doença em relação aos que permanecerão com a forma mais indolente (GONÇALVES *et al.*, 2009).

### Quadro 1 - Estadiamento da leucemia linfocítica crônica

a) Classificação dos cinco estadiamentos segundo Rai, 1975.			
0	Linfocitose apenas ( $\geq 15.000/\text{mm}^3$ no sangue ou $>40\%$ na medula)		
I	Linfocitose com aumento de linfonodos		
II	Linfocitose com esplenomegalia e/ou hepatomegalia, com ou sem aumento de linfonodos		
III	Linfocitose com anemia ( $\text{Hb} < 11\text{g/dL}$ ), com ou s/ aumento de linfonodos, fígado ou baço		
IV	Linfocitose com plaquetopenia ( $< 100.000/\text{mm}^3$ , com ou sem aumento de linfonodos, fígado ou baço)		
b) Classificação de estadiamento segundo Binet (adaptado HOFFBRAND, 2013)			
Estagio	Organomegalias <sup>1</sup>	Hemoglobina (g/dL) <sup>2</sup>	Plaquetas/ $\mu\text{L}$ <sup>2</sup>
A (50-60%)	0,1 ou 2 áreas	$\geq 10$	
B (30%)	3, 4 ou 5 áreas	$< 10$	$\geq 100.000$
C (<20%)	Não considerado		e/ou $< 100.000$

<sup>1</sup> Uma área= linfonodos  $> 1$  cm no pescoço, axilas, regiões inguinais, ou aumento do fígado

<sup>2</sup> Causas secundárias de anemia (p. ex., deficiência de ferro), ou anemia hemolítica autoimune ou trombocitopenia autoimune devem ser tratadas antes do estadiamento.

Fonte: adaptado GONÇALVES *et al.*, 2009 e HOFFBRAND, 2013

Legenda: Hb, Hemoglobina.

A LLC e o linfoma não-Hodgkin são as doenças oncohematológicas mais comuns e resultam na proliferação e diferenciação de células B. A imunofenotipagem da LLC é feita pela avaliação quantitativa de antígenos expressos nas células B leucêmicas (CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 e CD79). A patogênese da LLC, caracterizada pela replicação clonal de uma célula B, está associada aos defeitos na apoptose causados por alterações intrínsecas e extrínsecas que influenciam o comportamento das células B no microambiente do tecido (GHOSH *et al.*, 2010). Provavelmente, o evento primário no desenvolvimento da LLC está relacionado às células-tronco hematopoiéticas que, por se caracterizarem como multipotentes e autorrenováveis, têm capacidade de gerar células B clonais (KIKUSHIGE *et al.*, 2010).

Descobertas durante a última década mostraram que os RNAs não codificantes desempenham um papel central na patogênese molecular da LLC. Em particular, pequenos RNAs, denominados microRNAs (miRNAs ou miR), regulam a expressão gênica direcionando o RNA mensageiro (mRNA) para degradação ou repressão transcricional e estão envolvidos a nível pós-transcricional em muitos processos fisiológicos e patológicos. Redes de interação complexas compostas de genes codificantes e não codificantes foram encontradas e envolvidas no mecanismo patogênico da LLC, influenciando a história natural da doença (FERRAJOLI *et al.*, 2013). A transformação maligna das células B também está relacionada às deleções cromossômicas que levam à alteração na expressão de miRNAs envolvidos na resistência à apoptose. A redução dos miRNAs 15a e 16-1 estão correlacionados com a leucemogênese e provocam aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas e aumento da proliferação celular (KLEIN *et al.*, 2010).

Além do estadiamento clínico, a identificação de novos fatores prognósticos está entre os avanços mais importantes na compreensão da LLC. Entre eles existe um subgrupo de quatro principais alterações cromossômicas: a deleção de 13q14.3 (13q-), 11q (11q-), 17p (17p-) e a trissomia 12 (12+). Sabe-se que aproximadamente 80% dos pacientes com LLC possuem pelo menos uma dessas quatro alterações cromossômicas comuns. Também são considerados novos fatores prognósticos as alterações genéticas (principais genes: NOTCH1, BIRC3, SF3B1 e TP53), os miRNAs, a expressão da proteína

ZAP-70 e de CD38, o estado mutacional da imunoglobulina (IgVH), as proteínas de sobrevivência celular e os marcadores de sinalização celular (BTK, PI3k, proteína quinase B - AKT, SYK). Cabe ressaltar que o receptor da célula B (BCR) é alvo importante devido ao seu papel-chave na sinalização celular, na proliferação, na sobrevivência celular, na diferenciação e na apoptose. O tempo de duplicação de linfócitos (LDT) é considerado um fator prognóstico importante, onde pacientes com taxa de duplicação de linfócitos em um período menor que seis meses têm uma sobrevida média abaixo daqueles com linfocitose estável. Esses novos fatores podem contribuir para a identificação do paciente em um estágio clínico não avançado mas com risco potencial de progressão rápida da doença (CHIATTONE; FALCÃO, 2005; VYAS; HASSAN, 2012; SHAHJAHANI, 2015). Clinicamente, a LLC pode ser dividida em dois subconjuntos principais com diferentes tendências de progressão da doença, agressiva ou indolente, que se distinguem pela expressão de IgVH não mutada ou mutada, respectivamente (DANILOV, 2013; BYRD *et al.*, 2014).

O diagnóstico da LLC, muitas vezes, é feito em decorrência da investigação de linfocitose presente no hemograma de causa indeterminada (DIGHIERO, 2005). No entanto, o diagnóstico definitivo geralmente requer o mielograma, cujas células são analisadas por microscopia ótica e citometria de fluxo, para diagnosticar a leucemia e diferenciar seus subtipos. Na morfologia é comum a presença de linfócitos maduros, geralmente pequenos e sem nucléolo aparente, cromatina condensada e com as chamadas manchas de *Gumprecht* originadas do rompimento dos linfócitos e restos nucleares (FOERSTER *et al.*, 1993). Uma análise do sangue periférico mostra substituição dos elementos mielocíticos normais por linfócitos, que compreendem 25% a 95% de todas as células. A avaliação da medula óssea mostra uma infiltração linfocítica que pode ser nodular, difusa ou intersticial (HOFFBRAND, 2013). O diagnóstico diferencial da LLC envolve análises morfológicas, imunofenotipagem e técnicas citogenéticas para detecção de alterações cromossômicas que a difere de outras doenças linfoproliferativas (DYER *et al.*, 1994).

Pela avaliação imunofenotípica das células leucêmicas foi criado um sistema de pontuação baseado nos marcadores mais comuns da LLC (CD5+, CD23, FMC7-, expressão de imunoglobulina de superfície- Slg- e CD22). Esse sistema pontua cada um desses cinco marcadores com o valor de 1 ou 0, de acordo com a sua presença ou ausência, e é essencial no diagnóstico diferencial entre a LLC e outras neoplasias de células B. São considerados como LLC, os casos com pontuação igual a 3, 4 e 5, sendo 4 e 5 pontos mais comuns na LLC. As outras neoplasias de célula B, como os linfomas ou a tricoleucemia, geralmente apresentam pontuação de 0 a 2 (Quadro 2) (MATUTES *et al.*, 1994).

**Quadro 2 - Sistema de pontuação para diagnóstico de LLC**

Marcadores	Pontos	
	1	0
Slg	Fraco	Moderado/Forte
CD5	Positivo	Negativo
CD23	Positivo	Negativo
FMC7	Negativo	Positivo
CD22	Fraco/negativo	Moderado/forte

**Fonte:** adaptado MATUTES *et al*, 1994.

**Legenda:** CD, grupo de diferenciação; slg, imunoglobulina de superfície.

O tratamento da LLC envolve novas estratégias quimioterápicas como combinações de agentes alquilantes, análogos de purina e anticorpos monoclonais, ou mesmo transplantes de células-tronco hematopoéticas. Nas últimas décadas, foram desenvolvidos novos medicamentos focados em novos alvos e moléculas específicas, como o receptor BCR, a Bruton tirosina quinase (BTK), a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3k), a tirosina quinase do baço (SYK), as proteínas de apoptose e também os miRNAs. O tratamento mais apropriado para LLC é aquele que envolve no seu protocolo uma combinação de drogas

de acordo com os fatores prognósticos apresentados por cada paciente. Nesse sentido, a individualização do tratamento é essencial (BYRD *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2018).

## 2.2 Proteína quinase B: AKT

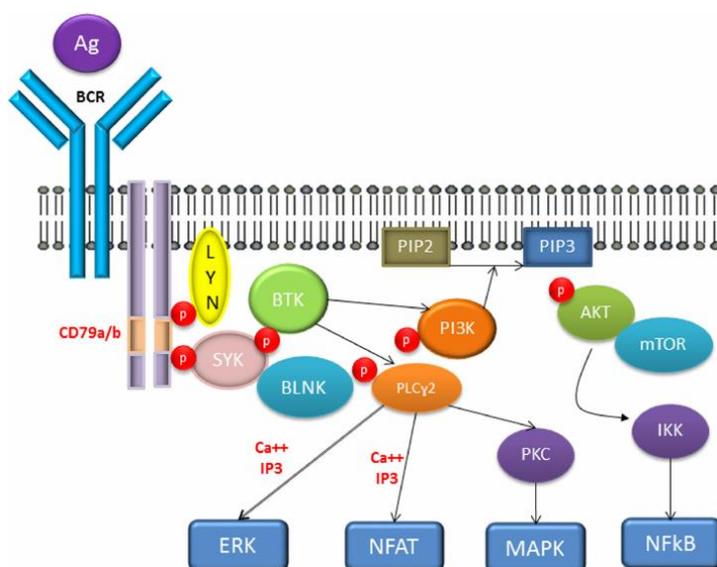
A LLC está associada a um desequilíbrio entre a proliferação celular, pela ativação de vias de sinalização dos linfócitos B, e sua capacidade de sofrer apoptose. A proteína quinase AKT está envolvida na cascata de sinalização que ocorre com a ativação do receptor BCR promovendo a sobrevida dos linfócitos na LLC (PETERS; LEYRAZ; PEREY, 1998).

A sobrevida aumentada de linfócitos B na LLC *in vivo* é considerada primariamente uma consequência da expressão desordenada de proteínas da família bcl-2. Essencialmente todas as células B da 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 razão aumentada de bcl-2/Bax têm sido associados com uma baixa resposta ao tratamento (PACKHAM; STEVENSON, 2005; LONGO *et al.*, 2007).

Os mecanismos de apoptose nos linfócitos B normalmente começam pela ativação do receptor de membrana BCR por antígenos que fosforilam e ativam os imunoreceptores Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  (CD79a/b) (Figura 1). Assim, ativa-se a proteína tirosina quinase Syk que promove a ativação da enzima fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e a fosfolipase Cy2. A PI3K leva à geração do segundo mensageiro fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato que induz a maior expressão de receptores BCR na membrana celular e ativa a proteína quinase AKT. A união de PI3K e AKT forma um complexo importante para a sobrevida da célula e proteção contra o processo de indução da morte celular, por ativar proteínas antiapoptóticas e inativar proteínas pró-apoptóticas e a caspase 9 (iniciadora da ativação das caspases causadoras da apoptose) (DATTA *et al.*, 1997; CARDONE *et al.*, 1998; POGUE *et al.*, 2000; RINGSHAUSEN *et al.*, 2002). A ativação da fosfolipase Cy2 causa a liberação de cálcio intracelular e a ativação da proteína quinase C, que é essencial para a ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPks); como a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), c-JUN quinase (JNK), p38 MAPK, transcrição de

fatores como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e o fator nuclear ativado por células T (NFAT). O fator nuclear  $\kappa$ B se mostra importante para estimulação de proteínas antiapoptóticas na LLC, se destacando, individualmente, como causador da longevidade celular (GRUMONT *et al.*, 1998; GRUMONT; ROURKE; GERONDAKIS, 1999; SAIJO *et al.*, 2002).

**Figura 1 - Vias de sinalização ativadas pela estimulação do receptor BCR**



Fonte: CHAVEZ; SAHAKIAN; PINILLA-IBARZ, 2013.

Legenda: Ag, antígeno; AKT, proteína quinase B; BCR, receptor de célula B; BLNK, proteína ligadora de célula B; BTK, tirosina quinase Bruton; ERK quinase regulada por sinal extracelular; IKK, inibidor de  $\kappa$ B quinase; LYN, tirosina quinase da família Src; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; NFAT, fator nuclear de ativado por célula T; NF $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ B; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinases; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PIP3, fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato; PKC, proteína quinase C; PLCy2, fosfolipase Cy2; SYK, tirosina quinase do baço.

O complexo PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B e a ERK podem ser ativados na LLC por estimulação do CD40 do linfócito B (com seu ligante CD154 do linfócito T), éster de forbol, pela albumina, interleucina 4 (IL-4), fator 1 derivado da célula estromal, com conseqüente diminuição da apoptose espontânea ou induzida

pelo quimioterápico (FURMAN *et al.*, 2000; BURGER *et al.*, 2000; BARRAGAN *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2003).

Estudos mostram que pacientes com LLC CD150 positivos têm alteração na síntese proteica devido à ativação da via AKT e mTORC1, por estarem envolvidas na biogênese e na iniciação e alongamento da tradução ribossômica. Por esse motivo esses pacientes apresentam alteração nas vias de sinalização que regulam a síntese proteica, aumento da sobrevivência celular e provavelmente da proliferação celular. O estudo de Gordiienko (2017) mostrou que a ativação de AKT e mTORC1 ativa a via de ERK1 ampliando os eventos de tradução (MENDOZA; ER; BLENIS, 2011; GORDIENKO *et al.*, 2017).

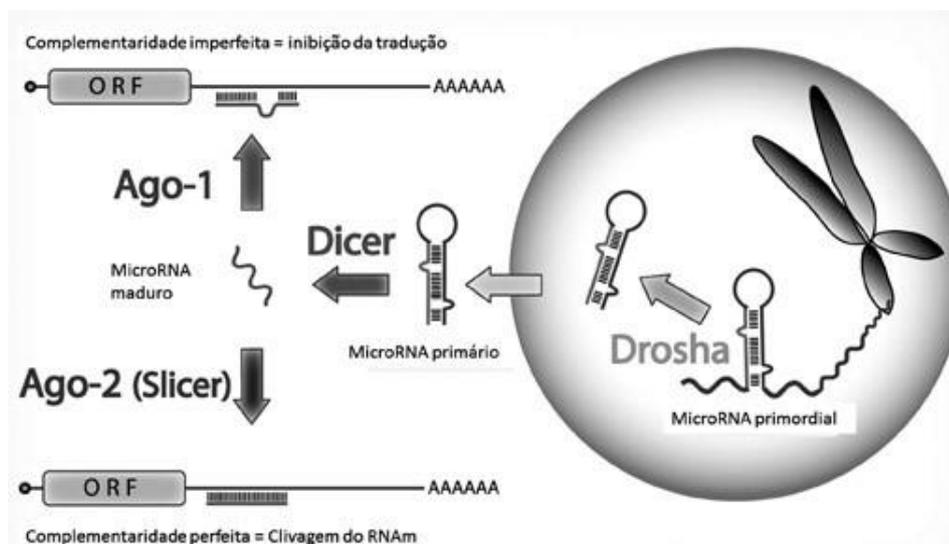
### 2.3 microRNAs

Os microRNAs (miRNAs ou miR) são pequenos RNAs com 20-22 nucleotídeos resultantes da clivagem de um RNA maior não codificante (STEPHENS *et al.*, 2014). A função dos miRNAs é se ligar a um RNA mensageiro (mRNA) alvo e modular a tradução de proteínas; essa modulação ocorre por inibição da tradução ou pela degradação do mRNA. Essas moléculas estão envolvidas em vários processos celulares, como apoptose, metilação do DNA, ciclo celular, crescimento e diferenciação celular. Na LLC, os miRNAs estão associados ao pior prognóstico, resistência ao tratamento e progressão da doença (DREGGER, 2013).

Os genes que sintetizam os miRNAs são transcritos, na sua maioria, pela RNA polimerase II. O miRNA primário (pri-miRNA) transcrito contém centenas de nucleotídeos, uma cauda de poliadenosinas na região 3' e um "cap" de 7-metilguanosina na região 5', semelhante ao mRNA. Esse miRNA primário contém regiões em que os nucleotídeos se pareiam e regiões não pareadas que formam alças. Ainda no núcleo, a RNase III- tipo drosha ligada a seu cofator DGCR8 quebra as ligações de regiões pareadas dos nucleotídeos do pri-miRNA, liberando uma estrutura similar à um grampo de cabelo denominada miRNA precursor (pré-miRNA) que possui 70 nucleotídeos aproximadamente. Os pré-miRNAs são levados para o citoplasma por proteínas transportadoras como a exportina 5 e a Ran-GTP (VARGAS;

MOREIRA, 2013). No citoplasma, o pré-miRNA é processado por uma segunda RNase III, denominada dicer que atua com a proteína TRBP (*trans-activation response RNA-binding protein*) e/ou a quinase PRKRA/PACT (*interferon-inducible double stranded RNA-dependent activator*), gerando um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silence complex*), que inclui as proteínas argonautas (Ago) como principais componentes. Do duplex, apenas uma fita será ativa e fará parte do complexo RISC maduro e a outra será degradada (FILHO; KIMURA, 2006). A figura 2 ilustra a formação do miRNA e sua ligação ao mRNA inibindo a tradução de proteínas alvo.

**Figura 2 - Síntese do microRNA e mecanismo de inibição da tradução do mRNA (Adaptado de Cuellar e MacManus, 2005)**



Fonte: SERRANO; THEODORO; PINHAL, 2014.

Legenda: Ago, porção Argonauta do complexo de RISC; Dicer e Drosha, RNases do tipo III; ORF, quadro de leitura aberto.

A seleção da fita ativa depende da estrutura do duplex, dos nucleotídeos na ponta 5' e da assimetria termodinâmica. A expressão alterada de componentes no processo de biogênese dos miRNAs como drosha, dicer e as

proteínas argonautas, têm sido associados aos diferentes tumores humanos (FILHO; KIMURA, 2006).

Os membros fundadores da classe dos miRNAs foram o lin-4 e o let-7 (*lethal-7*). A nomenclatura foi padronizada com a descoberta de novos miRNAs e leva em consideração a espécie, a localização e também o grau de maturação desse miRNA. Dessa forma, se o miRNA for maduro é escrito com a letra R em maiúsculo (ex. miR) e quando é de origem animal é escrito com o uso do hífen (ex. miR-16) e se fosse de plantas seria escrito sem o hífen. Além disso, se for um pré-microRNA de origem animal seria escrito com as letras em minúsculo e em itálico (ex. *mir-16*) e se fosse de plantas seria escrito em maiúsculo e em itálico. De acordo com a espécie o miRNA recebe as três primeiras letras de acordo com o organismo seguido de hífen (ex. *Homo sapiens*: hsa-miR-16). O miRNA ainda pode receber um sufixo que está relacionado a um precursor ou loci diferente no genoma que sinaliza os membros das famílias de miRNAs (ex. hsa-miR-16a) e as sequências idênticas dentro de uma espécie podem ser nomeadas com um sufixo numeral. O sufixo -3p e -5p podem ser adotados para diferenciar os miRNA originados de cada braço do pré-microRNA (ex. hsa-miR-16-1-5p) (AMBROS *et al.*, 2003; BUDAK *et al.*, 2016).

As primeiras evidências do envolvimento dos miRNAs em câncer vieram de estudos realizados na região 13q14, frequentemente deletada na LLC. Essa região é responsável pelos genes de dois miRNAs, o miRNA-15a e o miRNA-16-1, que inibem a expressão de um oncogene, posteriormente identificado como o gene bcl-2 responsável por codificar proteínas antiapoptóticas (bcl-2, Mcl-1). Estudos mostram que a depleção e alteração do miR-15a e do miR-16-1 foram observados em cerca de 66% dos pacientes com LLC (BALATTI *et al.*, 2015). Outros miRNAs também estão envolvidos na LLC como o miRNA-13 que é usado para diferenciar LLC indolente da agressiva, os miRNAs-21 e -155 que estão associados à alta mortalidade, o miRNA-181b que pode prever a progressão da doença, os miRNAs-148a, -222, -21 e -34b que levam a resistência à Fludarabina (um análogo de purina largamente utilizado em pacientes com LLC). Alguns miRNAs estão envolvidos na ativação, estimulação e sinalização de BCR e são também desregulados pela ativação

deste; a ativação de BCR reduz os níveis dos miRNAs-29c, -150, -181b, -223 que levará à baixa sobrevida dos pacientes e também o miRNA-155 está elevado na ativação da BCR e envolvido com a proliferação dos linfócitos B leucêmicos (BALATTI *et al.*, 2015; STAMATOPOULOS *et al.*, 2014).

Assim, os miRNAs podem alterar as vias de sinalização celular (através de BCR, ZAP-70, AKT, PI3k) induzindo a proliferação celular, a supressão tumoral (modulando TP53) e também as vias de apoptose levando à longevidade celular. Portanto, estudos envolvendo esses miRNAs têm ajudado a esclarecer os processos moleculares da instalação e progressão da doença (STAMATOPOULOS *et al.*, 2014, BALATTI *et al.*, 2015).

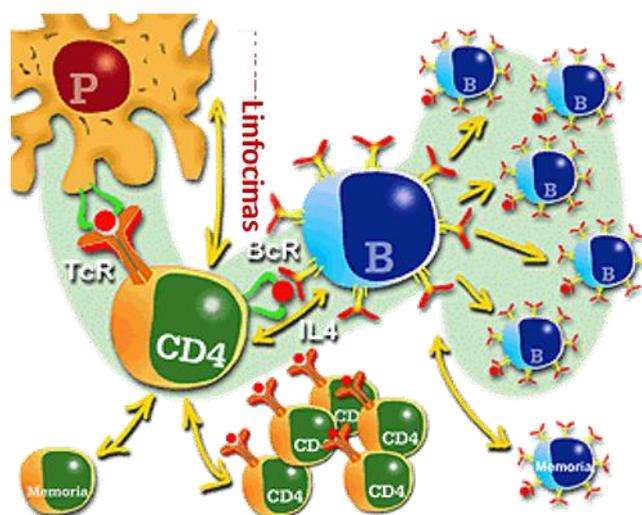
Além da participação na etiopatogenia de vários distúrbios, os miRNAs ainda podem contribuir como ferramenta de diagnóstico e de prognóstico, além de abrir um novo caminho para terapêutica na área médica (VARGAS; MOREIRA, 2013). Já existem estudos focando o tratamento na inibição competitiva de miRNAs oncogênicos e estimulando miRNAs supressores. Os oligonucleotídeos anti-microRNA (AMO) são inibidores dos locais de ação dos miRNAs oncogênicos. A eficácia terapêutica depende da sua capacidade de migrar pelo corpo, resistir à degradação pelas nucleases e do potencial do mecanismo de ação. Três tipos de AMOs foram descritos: antagomirs, bloqueador de ácidos nucleicos (LNAs) e oligonucleotídeos anti-sentido (ASOs). Outra abordagem terapêutica seria estimular a expressão de miRNA supressores de tumores para inibir o crescimento tumoral. Este tipo de terapia de reposição de miRNA pode ser realizada usando um vetor viral baseado no gene de interesse ou um miRNA mimético. A terapia direta baseada em miRNAs ainda requer aprimoramento e novos estudos são necessários (CORSINI, L.R. *et al.*, 2012; MONROIG; CALIN, 2013).

Atualmente, novos mecanismos relacionados com a patogênese da LLC vêm sendo descritos, bem como novas proteínas e potenciais biomarcadores vêm sendo estudados. Assim, faz-se necessário estudos adicionais buscando novos miRNAs que possam estar relacionados com esses biomarcadores e também estudos que aprofundem no mecanismo de ação de miRNAs já descritos. Dessa forma, este trabalho avaliou os miRNAs-let-7b e -26a, potenciais supressores de tumor, e -21 e -27a, potenciais oncogenes.

## 2.4 Interleucina-4 (IL-4)

A interleucina-4 (IL-4) é uma citocina produzida e secretada por células T ativadas, células NK, basófilos, eosinófilos e mastócitos. Age como anti-inflamatório, bloqueando a síntese de IL-1, TNF-alfa, IL-6 e proteína inflamatória de macrófagos. A estimulação parácrina pelo receptor de membrana IL-4 (IL-4R) induz cascatas de sinalização que levam à maturação de precursores de células B, células secretoras de imunoglobulina e células apresentadoras de antígenos, proliferação de células B ativadas, promove a diferenciação de linfócitos Th2 e é um potente inibidor da apoptose (OKADA; BANCHEREAU; LOTZE, 2003). A figura 3 mostra que com a liberação da IL-4 ocorre a estimulação e proliferação dos linfócitos B e linfócitos T CD4+ por meio da interação com uma célula apresentadora de antígenos (APC).

**Figura 3 - Ativação do linfócito T pela célula apresentadora de antígenos com posterior liberação de IL-4 levando à proliferação de linfócitos B e T CD4+**



Fonte: Adaptado de SÁNCHEZ-VISCAÍNO, Acesso em: 11 dez. 2017

Legenda: B, célula B; BcR, receptor de célula B; CD4, grupo de diferenciação 4; IL4, interleucina 4; P, célula apresentadora de antígenos, TcR, receptor de célula T.

As células leucêmicas na LLC expressam níveis elevados de receptor de IL-4 quando comparadas a células B *naïves*. Na LLC ocorre um aumento significativo de células T produzindo IL-4 e esse aumento está associado com a agressividade e progressão da doença (DOUGLAS *et al.*, 1997). Um estudo mostrou que a IL-4 está intimamente relacionada com o papel chave na patogênese da LLC e estimula a expressão CD79b e sIgM que aumenta a proliferação das células em resposta à ativação de BCR (GUO *et al.*, 2016).

Aguilar-Hernandez e colaboradores (2016) mostraram que a IL-4 aumenta a expressão de sIgM e a sinalização na maioria dos pacientes com LLC. Nesse estudo a IL-4 superou parcialmente a inibição da sinalização mediada pelo Ibrutinib e Idelalisib. Estes resultados sugerem que a IL-4 é capaz de promover a tumorigênese na LLC (AGUILAR-HERNANDEZ *et al.*, 2016).

Na LLC, a IL-4 também é capaz de suprimir a apoptose basal e induzida por quimioterapia, provavelmente por meio do aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas (STEELE *et al.*, 2010).

A via da IL-4 exerce a sua função antiapoptótica por meio da regulação positiva de miRNA-21. A IL-4 conduz a maturação dos precursores de células B e protege as células da apoptose espontânea ou da morte por agentes que danificam o DNA. Estes achados podem ser úteis no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas para a via de IL-4 na LLC (LAFUETE *et al.*, 2015).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica da proteína quinase AKT, de microRNAs e os níveis plasmáticos de IL-4 em pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) e em indivíduos saudáveis.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica da proteína quinase AKT.
- Avaliar a expressão gênica dos microRNAs -let-7b, -26a, -21 e -27a.
- Avaliar os níveis plasmáticos de IL-4.
- Correlacionar os dados obtidos com os dados laboratoriais dos pacientes com LLC.

## 4. PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados pelos médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais, dos quais foi obtida uma única amostra de sangue. O presente estudo está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), Projeto CAAE Nº 02177612.0.00005149, conforme parecer 34778, emenda E3/2016 (ANEXO I). Foi preenchida uma ficha clínica para cada paciente (ANEXO II), após os mesmos terem sido esclarecidos acerca dos objetivos do estudo e após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO III).

Os indivíduos do grupo controle foram selecionados na Academia da Cidade e também no Clube de Oficiais da Polícia Militar, em Belo Horizonte, MG. Foi feita uma ficha com os dados e exames desses indivíduos que também assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido específico para este grupo (ANEXO IV).

Esse estudo é do tipo caso-controle, no qual a comparação se faz entre um grupo de doentes (LLC) e um grupo de indivíduos sem a doença estudada.

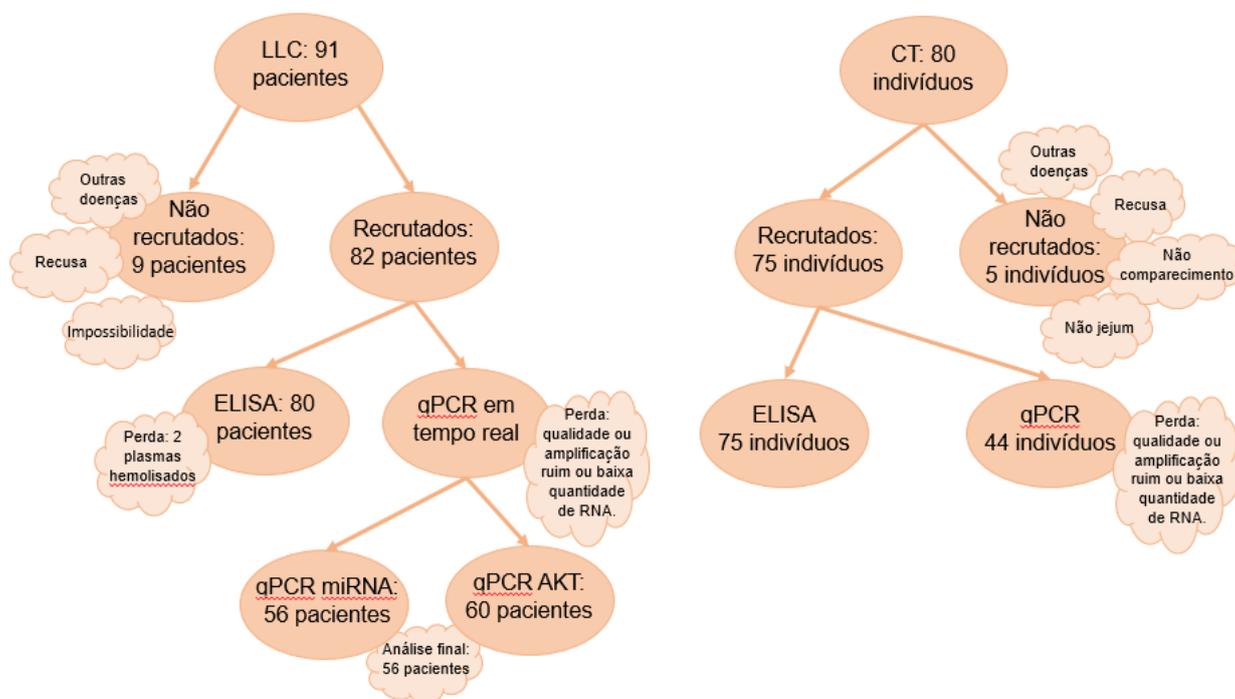
O tamanho da amostra foi calculado considerando a média dos valores obtidos e desvios padrão das principais variáveis do estudo. O nível de erro alfa ou nível de confiança foi de 5% correspondendo a 95% de intervalo de confiança. O nível de erro beta ou poder estatístico (1-beta) foi de 20% e o poder do teste maior que 80%. Por exemplo, considerando a variável IL-4, e os níveis estabelecidos acima, o tamanho amostral satisfatório seria 75 indivíduos. Foi considerada também a população estudada, baseada no número de pacientes disponíveis para coleta no ambulatório considerando os fatores de inclusão e exclusão, estado de saúde do paciente no dia da coleta e a literatura disponível sobre o assunto.

Neste estudo foram avaliados dois grupos:

- Grupo 1: constituído por 80 pacientes com diagnóstico de leucemia linfocítica crônica (LLC),
- Grupo 2: constituído por 75 indivíduos sem diagnóstico e histórico de neoplasias e com exames laboratoriais de triagem dentro dos intervalos de referência (grupo controle).

O fluxograma a seguir ilustra a seleção dos pacientes e indivíduos controles para cada teste realizado.

### Fluxograma 1 - Seleção dos pacientes e indivíduos controles



**Legenda:** CT, controle; ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; LLC, leucemia linfocítica crônica; qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com LLC se encontram no APÊNDICE I.

#### 4.1.1 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 os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Sistema de pontuação de Matutes, Estadiamento da leucemia linfocítica crônica (Classificação Rai) e Classificação do Grupo de Trabalho Internacional (Binet).

Para o grupo controle foram incluídos indivíduos aparentemente hígidos, sem diagnóstico e história de neoplasias hematológicas, e idade e sexo pareados com os pacientes com LLC. Alguns indivíduos apresentavam hipertensão e diabetes, dessa forma, para maior confiabilidade, foram feitos hemogramas de todos os indivíduos, cujos parâmetros se mostraram dentro dos intervalos de referência.

#### 4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os 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. Foram também excluídos pacientes que tinham outras doenças que levam à organomegalias e doenças mieloides.

Para o grupo controle, foram excluídos os indivíduos com histórico familiar de doenças neoplásicas hematológicas, em uso de antiinflamatórios ou ácido acetilsalicílico (AAS) (por alterarem os mecanismos apoptóticos), ou com alterações significativas no hemograma.

#### 4.1.3 Amostra biológica

Foram coletados 4,5mL de sangue total em tubos a vácuo com EDTA (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, Estados Unidos) que foram transportados em caixa de isopor contendo gelo para o local de análise. A coleta da amostra de sangue foi realizada no dia de atendimento dos pacientes com LLC no Serviço

de Hematologia do HC/UFMG. Foram coletadas, em média, amostras de sangue de 6 pacientes por dia. Dos indivíduos controles foi coletada uma única amostra de sangue de cada um antes de qualquer atividade física, na Academia da Cidade e no Clube dos Oficiais da Polícia de Minas Gerais. Foram coletadas em torno de cinco amostras de sangue por dia.

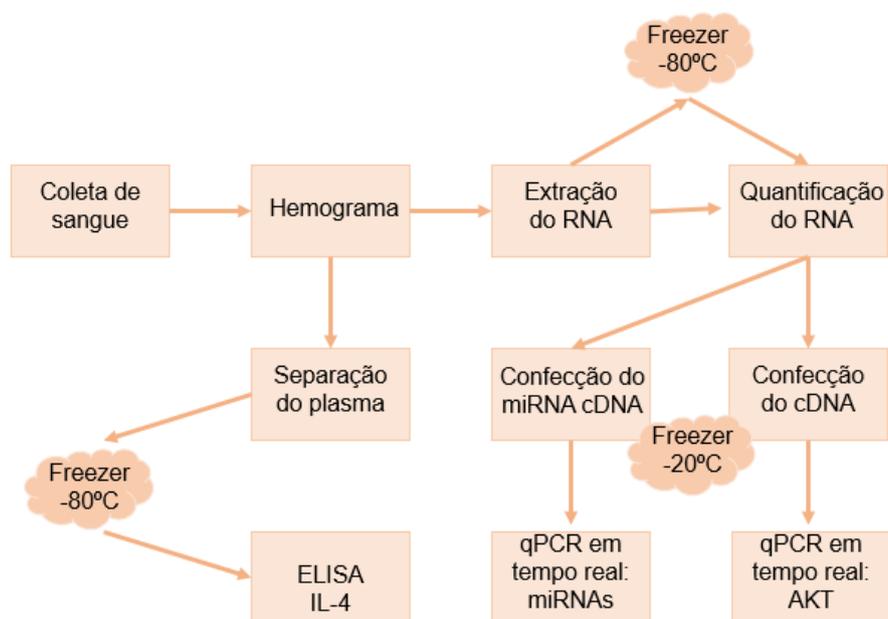
As amostras foram processadas, com no máximo 1h após a coleta, e analisadas seguindo-se rigorosamente as instruções dos fabricantes dos kits para cada reação realizada. O plasma foi separado utilizando a centrífuga Heraeus Multifuge X3R (Thermo Scientific™, Waltham, Estados Unidos), à 1100 g por 15min, o RNA extraído imediatamente após a coleta, tanto dos pacientes quanto dos controles, e as amostras foram acondicionadas em freezer -80°C (Ultra Freezer CL374-80V, freezer vertical, ColdLab, Piracicaba – SP, Brasil) até o momento das análises laboratoriais.

#### 4.2 Métodos

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos a partir das anotações nas fichas clínicas, além do acesso ao sistema computadorizado e aos prontuários arquivados no hospital. Todas as técnicas foram realizadas na Faculdade de Farmácia da UFMG, nos laboratórios de Hematologia, Bioquímica e no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Doenças Humanas.

O fluxograma a seguir ilustra as análises realizadas e a ordem seguida.

## Fluxograma 2 - Métodos



**Legenda:** cDNA, DNA complementar; ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa.

### 4.2.1 Hemograma

A amostra colhida em EDTA foi utilizada para realização do hemograma no mesmo dia com no máximo 1h30 após a coleta, no analisador hematológico Coulter T-890®, com o objetivo de obter as contagens de plaquetas, leucócitos totais, linfócitos absoluto e porcentagem, hemácias e dosagem hemoglobina. Foram confeccionadas lâminas com esfregaço do sangue periférico dos pacientes para conferência dos aspectos citomorfológicos.

### 4.2.2 Extração do RNA

A extração de RNA do sangue total foi realizada com o kit TRIzol® (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA) seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A extração foi feita imediatamente após cada coleta.

Primeiramente foi adicionado ao sangue total uma solução de lise para lisar os eritrócitos e, após centrifugar e ressuspender o pellet de leucócitos, foi adicionada uma solução contendo etanol capaz de lisar os leucócitos. Realizou-se um tratamento com DNase e, após lavagens, foi possível ressuspender o RNA em água livre de RNase. As amostras de RNA foram estocadas no freezer à -80°C até o momento de uso.

#### 4.2.3 Quantificação do RNA

Uma alíquota de 1µL de cada amostra de RNA total foi quantificada utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido), nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm.

A pureza das amostras foi verificada a partir da relação 260/280nm, considerando a relação (260/280) das densidades ópticas (OD) igual ou maior que 1.8, como referência de boa qualidade para uso.

#### 4.2.4 Confeção do cDNA

O cDNA foi obtido utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* kit (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA) para a expressão do mRNA da proteína quinase AKT. Foi adicionada uma alíquota de 2µL de cada iniciador 10 × RT (Random Primers) em cada tubo e, em seguida, adicionado 0,8µL do mix RNA RT. Em cada tubo de RT foi adicionado 1µg da amostra de RNA. O volume final de reação foi, portanto, de 20µL 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. Os tubos foram armazenados em freezer -20°C (FE26, freezer vertical, Electrolux, Estocolmo, Suécia) até o momento de uso.

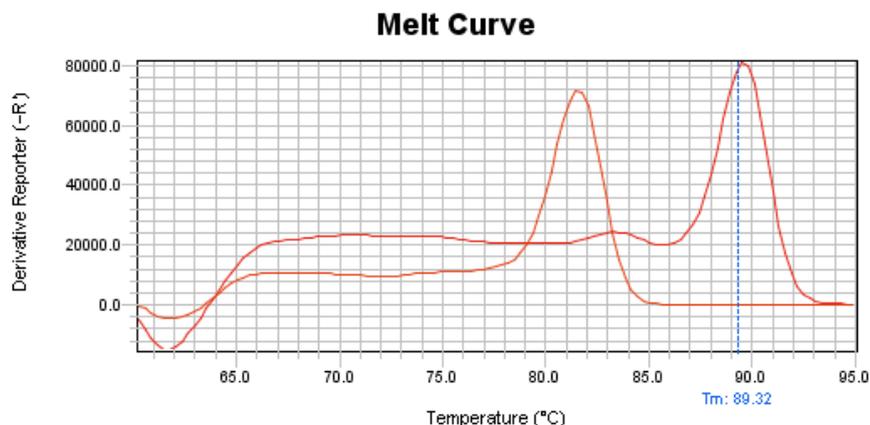
Para os miRNAs foi utilizado o kit *miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) para confecção do cDNA seguindo todas as etapas: poliadenilação, purificação do RNA e a síntese, conforme instruções do fabricante.

#### 4.2.5 PCR em tempo real

Uma vez sintetizado, o cDNA foi submetido à amplificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para quantificação relativa da expressão da proteína quinase AKT e dos miRNAs hsa-let-7b-5p (miR-let-7b), hsa-miR-26a-5p (miR-26a), hsa-miR-21-5p (miR-21) e hsa-miR-27a-3p (miR-27a), utilizando o sistema Sybr Green (Agilent Technologies - Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix-modo fast), conforme protocolo. A PCR foi realizada no equipamento Applied Biosystems StepOne - Real Time PCR System (Thermo Fisher™, Waltham, Estados Unidos) para as análises da AKT e no QuantStudio 3 - Real Time PCR System (Thermo Fisher™, Waltham, Estados Unidos) para as análises dos miRNAs. A quantificação de cada amostra foi realizada em duplicata e o método utilizado foi o de comparação de  $\Delta\Delta C_T$ . O GAPDH foi usado como controle endógeno da reação para AKT e o U6 para os miRNAs, além de uma amostra referência que foi escolhida dentre os indivíduos do grupo controle como parâmetro de normalidade e utilizada para todas as análises.

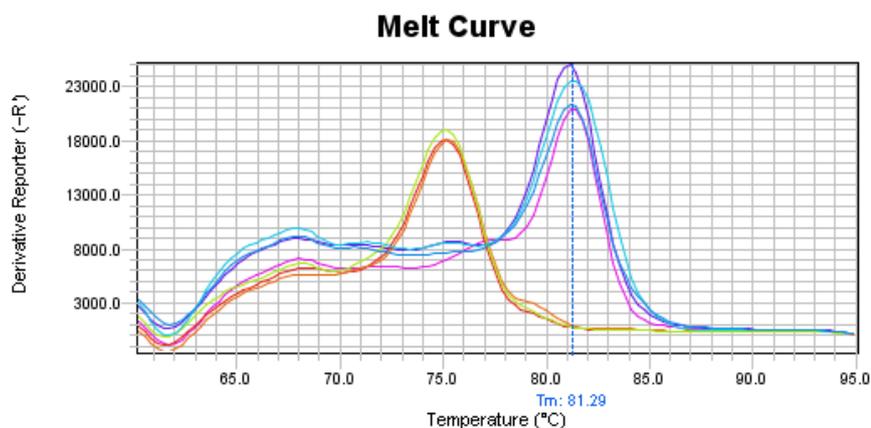
Para a expressão do mRNA da AKT, na ativação da polimerase o equipamento foi programado para aquecer até 95°C por 3 minutos. Em seguida, foram feitos 40 ciclos de desnaturação (95°C por 5 segundos), anelamento e amplificação (62°C por 10 segundos). Na curva melt, a AKT apresentou uma temperatura de *melting* ( $T_m$ ) em torno de 89 e o GAPDH em torno de 83, conforme mostra a figura 4 tirada dos resultados apresentados pelo equipamento. Para os miRNAs na ativação da polimerase, o equipamento foi programado para aquecer até 95°C por 3 minutos. Em seguida, foram feitos 40 ciclos de desnaturação (95°C por 5 segundos), anelamento e amplificação (60°C por 10 segundos). A  $T_m$  para os miRNAs-let-7b, -26a, -21 e -27a foi em torno de 75°C, enquanto o U6 que foi usado como controle endógeno apresentou a  $T_m$  em torno de 81°C, conforme mostra a figura 5. Todos esses valores ficaram dentro do esperado, indicando a reprodutibilidade do ensaio.

**Figura 4 - Curva melt da AKT com Tm em torno de 89°C e do GAPDH com Tm em torno de 83°C**



**Legenda: Tm, temperatura de *melting*.**

**Figura 5 - Curva melt dos microRNAs com Tm em torno de 75°C e U6 com Tm em torno de 81°C**



**Legenda: Tm, temperatura de *melting*.**

#### 4.2.6 Determinação dos níveis plasmáticos da IL-4

A concentração plasmática da IL-4 foi quantificada pelo método imunoenzimático (ELISA-*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Foi utilizado o kit Human IL-4 ELISA (ImmunoTools®, Gladiolenweg, Alemanha). O princípio do teste consiste na captura dos antígenos de IL-4 presentes no plasma por anticorpos de captura anti-IL-4 humanos, fixados na superfície de uma microplaca.

A sensibilização da microplaca foi realizada com anticorpo monoclonal de captura (fornecido pelo fabricante) diluído 1:100 em tampão de fosfato salino (PBS), conforme instrução do fabricante. A cada poço da microplaca foram adicionados 100µL da solução de sensibilização.

Após incubação *overnight* em refrigerador à -20°C, os anticorpos não ligados foram removidos por meio de lavagens sucessivas. As lavagens foram realizadas com solução de PBS + 0,05% Tween 20.

Em seguida à lavagem foi feito o bloqueio, adicionando a cada poço da microplaca 300µL da solução de bloqueio (PBS + 2% BSA + 0,05% Tween 20) e, posteriormente, essa foi incubada por uma hora à temperatura ambiente. Após incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e lavagens sucessivas foram realizadas com solução de PBS + 0,05% Tween 20 (solução de lavagem).

O calibrador do kit, que contém 50ng de rhIL-4, foi reconstituído com PBS + 2% BSA + 0,05% Tween 20 e, posteriormente, realizado diluições seriadas e a determinação da IL-4 foi feita em duplicata.

Após a adição de 100µL dos calibradores ou amostras-testes diluídas a cada um dos poços, a microplaca foi incubada por duas horas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Os antígenos não capturados foram removidos por lavagens sucessivas. Cada um dos poços foi lavado cinco vezes com PBS + 0,05% Tween 20. Em seguida, foi adicionado um volume de 100µL do anticorpo detector biotilado diluído 1:100 em PBS + 2% BSA + 0,05% Tween 20. A microplaca foi incubada por duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas lavagens sucessivas utilizando a solução de lavagem. A revelação dos antígenos capturados na primeira etapa foi feita pela reação da enzima peroxidase (HRP), ligada ao segundo anticorpo, com o substrato TMB (3, 3', 3, 5' -tetrametilbenzidina), gerando um produto de coloração azul. Essa reação foi interrompida pela adição de 50µL ácido sulfúrico (2M) e a cor no final da reação torna-se amarela. A absorbância da cor foi lida em 450nm e a intensidade dessa foi diretamente proporcional à concentração de IL-4 na amostra plasmática.

O limite de detecção do teste é de 2,3 pg/mL. A determinação da IL-4 foi realizada em 100µL de plasma em EDTA.

A leitura das placas foi feita no leitor de placas VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, São José, Califórnia, USA). A concentração de IL-4 de cada amostra foi detectada automaticamente pelo equipamento, sendo baseada nas determinações obtidas das diluições dos calibradores. A curva padrão teve cinco pontos em duplicata incluindo o branco (pontos: 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL e 62,5 pg/mL) e um  $R^2$  de 0,996.

#### 4.2.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa “Sigma Stat” versão 2.03 e apresentados como média e desvio padrão no caso de distribuição normal, enquanto os resultados que não seguiram distribuição normal foram apresentados como mediana e intervalo interquartil. Foi utilizado o teste de Shapiro Wilk para determinar se a distribuição era normal ou não. Para as variáveis com distribuição normal foi empregada a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Tukey para comparação de três grupos, e para as situações de comparação de dois grupos, foi realizado o teste t de Student. Para aquelas variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi empregado o método não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn’s para comparação de mais de dois grupos e o teste não paramétrico de Mann Whitney para comparação de dois grupos. A investigação da correlação entre os parâmetros estudados foi realizada pela correlação de Pearson para variáveis quantitativas e Spearman para variáveis qualitativas. Foi considerado significativo valor de  $p < 0,05$  e o intervalo de confiança foi de 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização dos pacientes e controles

Neste estudo foram envolvidos 155 indivíduos sendo 80 pacientes com LLC e 75 controles. No entanto, por limitações técnicas, o número de pacientes e o de controles analisados nas expressões gênicas (proteína quinase AKT e miRNAs) foi inferior ao descrito sendo um total de 100 indivíduos, 56 pacientes com LLC e 44 controles.

Na tabela 1 são apresentados os dados demográficos referentes aos pacientes com LLC e o grupo controle.

**Tabela 1 - Caracterização dos pacientes com LLC e indivíduos do grupo controle em relação ao sexo, média de idade e faixa etária**

Grupos	N	Homens	Mulheres	Idade* (anos)
LLC	56	31	25	67 (56-77)
Controles	44	17	27	71 (66-76)
Total	100	48	52	-
Valor de p	-	p=0,099	p=0,099	p=0,122

\*Mediana

Legenda: LLC, leucemia linfocítica crônica.

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

A caracterização dos pacientes em relação aos controles e quanto à classificação de Binet e dados do hemograma são mostrados nas Tabelas 2 e 3. Os grupos B e C de Binet foram fundidos devido ao número reduzido de pacientes contidos nesses grupos.

De todos os pacientes estudados, 36 foram classificados como baixo risco (Binet A) e 20 como risco moderado/grave (Binet B+C).

**Tabela 2 - Caracterização dos pacientes em relação aos controles quanto aos dados do hemograma**

Grupo*	Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	Linfócitos (10 <sup>3</sup> /μL)	Leucócitos totais (10 <sup>3</sup> /μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hemácias (10 <sup>3</sup> /μL)
<b>LLC (n=56)</b>	144,00 (110,00-187,00)	13,783 (4,650-37,392)	19,400 (7,400-48,300)	12,300 (10,600-13,700)	4,06 (3,420-4,770)
<b>Controle (n=44)</b>	198,50 (167,00-232,50)	2,528 (1,996-3,117)	5,550 (4,100-6,300)	14,700 (13,300-16,400)	5,195 (4,565-5,550)
<b>Valor de p</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

\*Resultados em mediana e intervalo interquartilico

Legenda: LLC, leucemia linfocítica crônica.

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

**Tabela 3 - Caracterização dos pacientes em relação à classificação de Binet e dados do hemograma**

Grupo*	Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	Linfócitos (10 <sup>3</sup> /μL)	Leucócitos totais (10 <sup>3</sup> /μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hemácias (10 <sup>3</sup> /μL)**
<b>A (n=36)</b>	170,000 (126,000-200,000)	15,491 (5,784-36,220)	20,000 (8,777-44,947)	12,750 (11,450-14,425)	4,23 (±1,060)
<b>B + C (n=20)</b>	106,000 (63,000-140,000)	11,660 (4,264-44,792)	17,200 (5,200-50,900)	10,900 (9,800-13,000)	3,629 (±0,923)
<b>Controle (n=44)</b>	198,500 (167,000-232,500)	2,528 (1,995-3,117)	5,550 (4,100-6,300)	14,700 (13,300-16,400)	5,162 (±0,715)
<b>p value</b>	p<0,05 <sup>a,b,f</sup>	p<0,05 <sup>c,d</sup>	p<0,05 <sup>c,d</sup>	p<0,05 <sup>a,b</sup>	p<0,05 <sup>a,b,f</sup>

<sup>a</sup>CT x B+C; <sup>b</sup>CT x A; <sup>c</sup>A x CT; <sup>d</sup>B+C x CT; <sup>e</sup>B+C x A; <sup>f</sup>A x B+C

\*Resultados em mediana e intervalo interquartilico

\*\*Resultados em média e desvio padrão

Legenda: LLC, leucemia linfocítica crônica

**Teste estatístico: Normalidade, Shapiro-Wilk; comparação de três grupos, ANOVA: Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla, Dunn's e Holm-Sidak.**

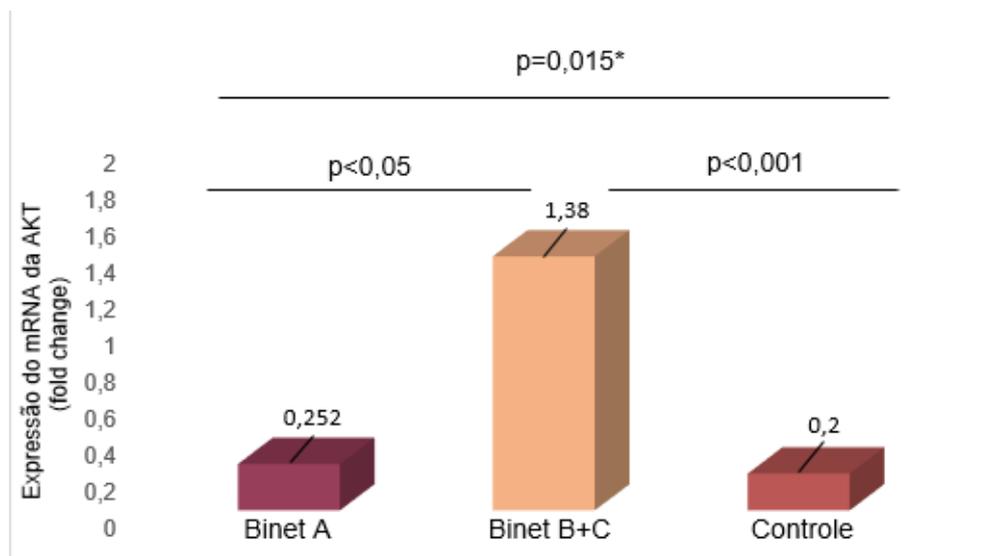
Diferença significativa foi observada no número de plaquetas e hemácias tanto entre os grupos A e B+C e também quando comparados ao grupo controle, estando reduzido nos pacientes com LLC ( $p < 0,05$ ). Também houve diferença quanto ao número de linfócitos, mais elevado nos grupos A e B+C em relação aos controles ( $p < 0,05$ ). Ao analisar os leucócitos totais observou-se diferença entre os grupos A e B+C comparados aos controles, sendo significativamente mais elevada nos pacientes com LLC ( $p < 0,05$ ). Em relação à hemoglobina, os níveis foram significativamente reduzidos nos pacientes independente do grupo de Binet quando comparados aos controles ( $p < 0,05$ ).

Apesar da diferença de valores de referência para a hemoglobina entre homens e mulheres, observou-se que, quando analisados separadamente, a diferença dos níveis de hemoglobina continuou sendo significativa entre homens [ $p < 0,001$ ; LLC: mediana=12,350g/dL (10,125-14,150); CT: mediana=14,400g/dL (13,250-15,750)] e mulheres [ $p < 0,001$ ; LLC: mediana 12,200g/dL (11,000-13,600); CT: mediana=14,350g/dL (13,300-16,075)] sendo mais elevados nos controles quando comparados aos pacientes.

## 5.2 Expressão gênica da proteína quinase AKT

A avaliação do mRNA da AKT foi feita nas amostras de 56 pacientes e de 44 controles. Houve um aumento significativo da expressão gênica do mRNA da AKT nos pacientes quando comparados aos controles ( $p = 0,015$ ). Quando estratificados de acordo com o estadiamento da doença, foi observada diferença significativa entre os grupos, sendo mais elevada no grupo B+C ( $p < 0,05$ ). O grupo de Binet B+C também se mostrou com expressão de AKT elevada quando comparado aos controles ( $p < 0,001$ ), nesse grupo tiveram três pacientes que com valores destoantes de expressão de 74,25, 200,53 e 1002,97. Os valores observados para a relação entre a expressão gênica de AKT para cada grupo de Binet estão representados no Gráfico 1 e na Tabela 4.

**Gráfico 1 - Expressão gênica da AKT no grupo Binet A, Binet B+C e grupo controle**



\*valor de p entre pacientes com LLC e controles

\*\*Valores em mediana

**Tabela 4 - Expressão gênica de AKT em relação à classificação de Binet**

Grupo*	AKT
A (n=36)	0,252 (0,0963-1,650)
B + C (n=20)	1,380 (0,280-25,970)
Controle (n=44)	0,200 (0,068-0,780)
p value	p<0,05 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>B+C x CT; <sup>b</sup>B+C x A

**\*Resultados em mediana e intervalo interquartilico**

**\*\*Grupo Binet A e Binet B+C**

### 5.3 Expressão gênica dos microRNAs

A expressão gênica dos miRNAs foi realizada em 56 pacientes e em 44 controles. A tabela 5 mostra os valores da expressão gênica para cada miRNA. Houve diferenças significativas na expressão gênica do miRNA-let-7b ( $p < 0,001$ ) e do miRNA-26a ( $p < 0,001$ ), ambos supressores de tumor, sendo significativamente reduzidos nos pacientes com LLC quando comparados aos controles. Considerando a expressão gênica do miRNA-let-7b, os pacientes tiveram uma mediana de expressão de 0,066 enquanto os controles tiveram mediana de 1,36. Alguns pacientes Binet B+C apresentaram expressão zero ou muito próximo de zero. Quanto ao miRNA-26a, a maioria dos pacientes também apresentou expressão baixa com mediana de 0,20, enquanto os controles tiveram mediana de 1,37.

Não houve diferenças significativas quando comparados os pacientes e controles para os miRNAs-21 e -27a, ambos oncogenes. Entretanto, alguns pacientes apresentaram expressões consideravelmente destoantes em relação aos demais. Considerando a expressão gênica do miRNA-21, a maioria dos pacientes apresentou expressão média em torno de oito, enquanto dois pacientes Binet A atingiram 144,76 e 243,17, e um paciente Binet B+C atingiu o valor de expressão de 145,48. Em relação ao miRNA-27a, a maioria dos pacientes Binet A apresentou expressão baixa, mas alguns pacientes se destacaram com expressão de 38,01, 27,68 e 15,66, enquanto os pacientes Binet B+C tiveram um aumento maior com destaque para dois pacientes com expressão de 687,9 e 102,61. Não houve diferenças significativas quando comparados os pacientes entre os grupos de Binet.

**Tabela 5 - Expressão gênica dos microRNAs nos pacientes com LLC e controles**

Grupo*	miR-let-7b	miR-26a	miR-21	miR-27a
<b>LLC</b> <b>(n=56)</b>	0,0660 (0,028-0,270)	0,207 (0,049-0,435)	0,270 (0,079-3,470)	0,250 (0,080-1,090)
<b>Controle</b> <b>(n=44)</b>	1,360 (0,378-2,430)	1,370 (0,500-3,320)	0,360 (0,120-1,800)	0,635 (0,159-1,995)
<b>Valor de p</b>	p<0,001	p<0,001	p=0,614	p=0,125

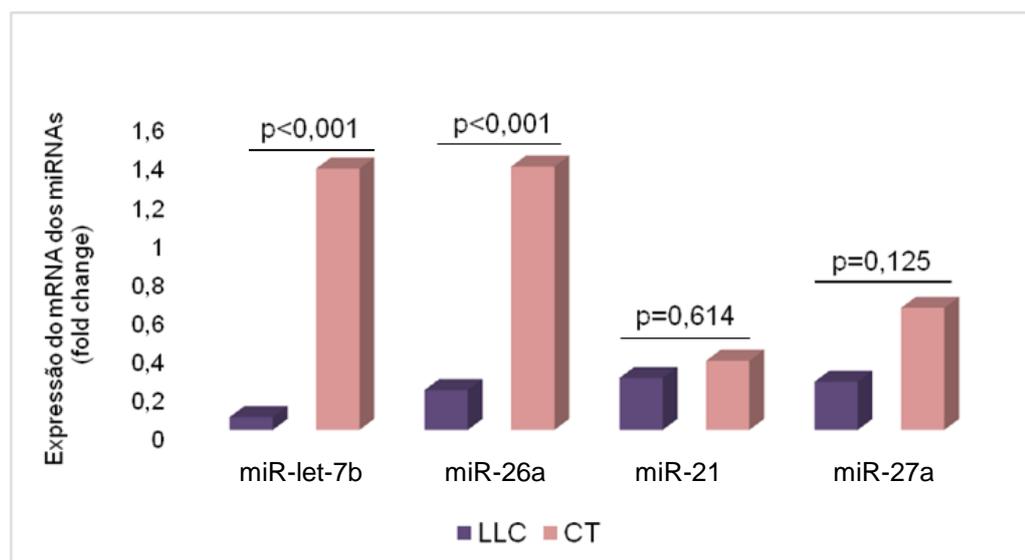
\*Resultados em mediana e intervalo interquartilico

Legenda: LLC, leucemia linfocítica crônica.

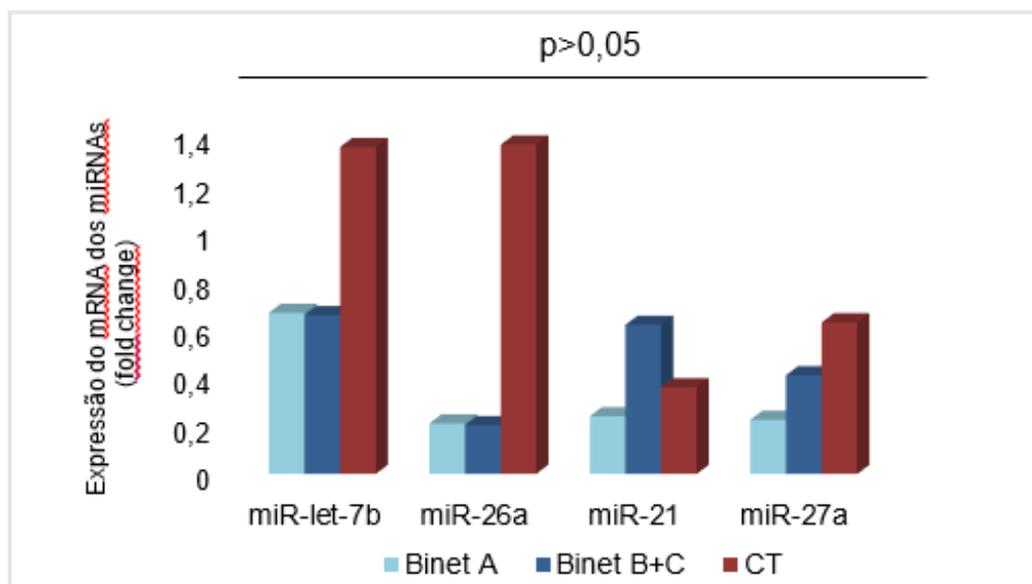
Teste estatístico: Normalidade, Shapiro-Wilk; Comparação de dois grupos, Mann-Whitney.

Os Gráficos 2 e 3 ilustram a mediana dos valores de expressão gênica de cada miRNA, de acordo com os grupos dos pacientes com LLC e controles.

**Gráfico 2 - Mediana dos valores da expressão gênica de cada miRNA de acordo com o grupo dos pacientes com LLC e controles**



**Gráfico 3 - Mediana dos valores da expressão gênica de cada miRNA de acordo com o grupo de Binet, A ou B+C e controles**



\*Valor de p entre os grupos de Binet.

Visando identificar os pacientes com maior potencialidade de pior evolução, foram investigadas correlações entre as novas variáveis (AKT e miRNAs) avaliadas nesse estudo e os parâmetros laboratoriais de uso convencional na LLC (dosagem de hemoglobina, número de leucócitos total, linfócitos, plaquetas, e outros parâmetros apresentados no APÊNDICE I). As seguintes correlações foram significativas (Spearman;  $p < 0,05$ ): AKT *versus* estadiamento de Binet,  $r = 0,584$  e  $p = 0,0258$ , miR-27a *versus* miR-21,  $r = 0,400$  e  $p = 0,004$ ; miR-27a *versus* miR-let-7-b,  $r = -0,331$  e  $p = 0,01$ ; miR-let-7b *versus* miR-26a,  $r = 0,327$  e  $p = 0,01$ ; miR-27a *versus* beta2-microglobulina,  $r = 0,640$  e  $p = 0,01$ .

#### 5.4 Concentração plasmática de IL-4

A concentração plasmática de IL-4 foi quantificada em 80 pacientes com LLC e em 75 controles. Não houve diferenças significativas entre o sexo ( $p = 0,561$ ) ou idade ( $p = 0,060$ ) entre os pacientes comparados aos controles (Tabela 6). Diferença significativa foi observada quando comparados os níveis de IL-4 entre pacientes e controles ( $p < 0,001$ ), estando os níveis desta

interleucina mais aumentados nos controles quando comparados aos pacientes conforme mostra a tabela 6 e também o Gráfico 4. Dentre os pacientes, 26 eram Binet B+C e 54 Binet A e, quando comparada a quantificação da interleucina entre os grupos de Binet, não foram encontradas diferenças significativas, embora dois pacientes Binet B+C tenham apresentado os valores mais altos (1004,38pg/mL e 1134,01pg/mL), mesmo quando comparamos com os valores dos controles.

**Tabela 6 – Níveis plasmáticos de IL-4**

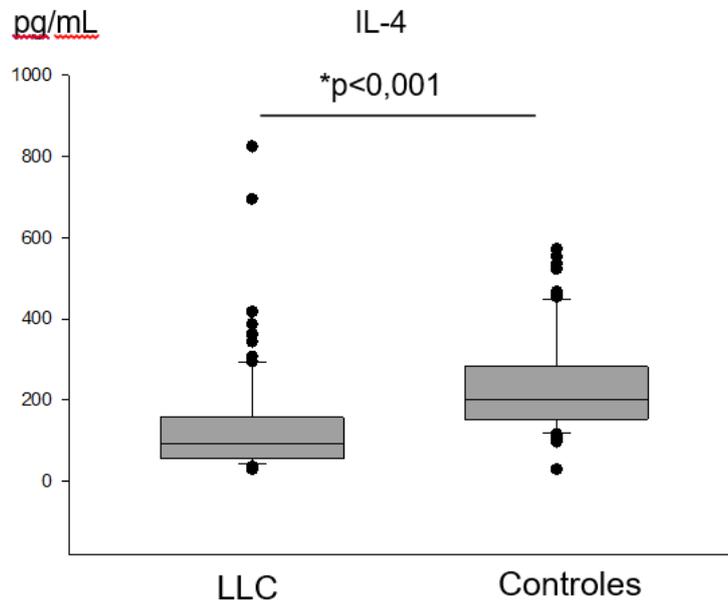
<b>Grupo*</b>	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>IL-4 (pg/mL)</b>
<b>LLC (n=80)</b>	36	44	67,700 (58,200-77,050)	90,802 (55,309-157,160)
<b>Controle (n=75)</b>	37	38	71,000 (66,500-77,500)	201,914 (152,531-282,160)
<b>Valor de p</b>	p=0,561	p=0,561	p=0,060	p<0,001

\*Resultados em mediana e intervalo interquartilico

Legenda: LLC, leucemia linfocítica crônica; IL-4, interleucina 4.

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

**Gráfico 4 - Representação dos níveis plasmáticos de IL-4 dos pacientes com LLC *versus* controles**



\*Dados apresentados em mediana e intervalo interquartilico

Legenda: LLC, leucemia linfocítica crônica; IL-4, interleucina 4.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização dos pacientes

A avaliação da caracterização laboratorial dos indivíduos participantes do presente estudo mostrou resultados dentro do esperado.

A mediana de idade dos pacientes avaliados não apresentou diferença significativa quando comparada à do grupo controle. Como já relatado a LLC acomete majoritariamente idosos com a idade média de 65 anos podendo, excepcionalmente, acometer jovens e adultos (CHIATTONE; FALCÃO, 2005).

Os estágios mais avançados, tanto de Rai quanto de Binet, são caracterizados por uma anemia e/ou trombocitopenia (GONÇALVES *et al.*, 2009). Nos pacientes envolvidos no estudo observou-se uma queda significativa de plaquetas e da hemoglobina naqueles classificados como Binet A e ainda maior nos B+C, quando comparados aos controles. Dessa forma, estes dados estão de acordo com o esperado. A maioria dos pacientes desse estudo era Binet A, o que sugere avanços no diagnóstico precoce na população, ainda que existam diferenças sociais, econômicas e culturais.

Sabendo que a LLC é uma doença caracterizada pelo acúmulo de pequenos linfócitos B monoclonais no sangue, medula óssea e tecido linfóide (ALLEN *et al.*, 2014), no presente estudo também foi observada uma linfocitose a qual foi significativamente maior em ambos os grupos, A e B+C, em relação aos indivíduos controles. Como esta linfocitose leva à uma leucocitose, os dois grupos também apresentaram os leucócitos totais significativamente superior aos do grupo controle.

### 6.2 Aumento da expressão gênica da Proteína quinase AKT nos pacientes com LLC

A análise dos dados da AKT revelou maior expressão do mRNA nos pacientes com LLC como um todo, em relação aos controles. Porém, é possível detectar que nem todos os pacientes apresentaram alta expressão

da AKT, sendo que a mediana dos pacientes (0,615) se insere dentro do intervalo interquartilico do grupo controle (0,068-0,785). Por outro lado, no grupo dos pacientes, valores bem superiores de AKT foram observados (Q3=3,470) demonstrando uma tendência de aumento significativo. Quando se reporta aos dados de AKT estratificados segundo o estadiamento de Binet, é possível observar que o subgrupo B+C apresentou valores significativamente mais altos em relação aos controles e ao subgrupo A. Dessa forma, pode-se admitir que o aumento de expressão do mRNA da AKT foi consistente com as formas mais graves da LLC, sinalizando assim para um valor prognóstico desfavorável deste biomarcador. No entanto, cumpre ressaltar que alguns pacientes do subgrupo A também apresentaram maior expressão do mRNA da AKT (Q3=1,655), o que sugere que tais pacientes devam ser acompanhados com maior frequência e rigor clínico visando a identificação daqueles que evoluirão desfavorável e precocemente.

Quando foram comparados os resultados de AKT com os parâmetros incluídos na classificação de Binet, como dosagem de hemoglobina, leucócitos totais e de linfócitos, e contagem de plaquetas, foi possível verificar consistência entre o primeiro parâmetro analisado e os convencionais. Dessa forma, valores mais altos de expressão do mRNA da AKT no subgrupo B+C coexistiram com valores mais baixos de hemoglobina e de plaquetas e mais altos de leucócitos totais e de linfócitos. Ao contrário, no subgrupo A, valores mais baixos de AKT coexistiram com valores menos reduzidos de hemoglobina e de plaquetas e menos elevados de leucócitos totais e de linfócitos. Tais achados permitem atribuir um potencial valor prognóstico à avaliação da expressão do mRNA da AKT, já que à princípio, este novo biomarcador parece estar relacionado estreitamente com as taxas de hemoglobina, e contagens de leucócitos totais, linfócitos e plaquetas. Quando foram exploradas as correlações entre AKT e os parâmetros da classificação de Binet foi possível verificar que, de fato, a AKT se correlacionou com os parâmetros acima tradicionalmente utilizados para estadiamento da LLC.

Considerando que a evolução clínica do paciente com LLC não pode ser prevista apenas com os biomarcadores que já estão disponíveis e, com base nos nossos achados, é oportuno recomendar a inclusão da avaliação da expressão do mRNA da AKT, considerando a viabilidade da análise, no elenco

de biomarcadores com potencial valor prognóstico, certamente agrega valor ao que já existe.

Cumpramos ressaltar que os dados relacionados à expressão do mRNA da AKT estão em concordância aos relatados por Singh e colaboradores (2017), os quais demonstraram que em linhagens celulares de camundongos com LLC a inibição da sinalização de PI3k e AKT levou à redução significativa da sobrevivência das células. Esse mesmo estudo e outros (CHENG *et al.*, 2014; PALACIOS *et al.*, 2015), reportaram que o tratamento dessas linhagens celulares com novos alvos de tratamento como pequenas moléculas específicas para Btk (Ibrutinib) ou PI3k (Idelalisib), que estão relacionadas com a inibição da via da AKT, levam à redução da viabilidade, da adesão dependente de fibronectina e da proliferação celular.

Ainda relacionados aos nossos achados, Chapman e colaboradores (2017) relataram o papel e a importância da AKT na sobrevivência, crescimento e proliferação dos linfócitos B na LLC por meio da estimulação de CD40. Esse estudo também confirmou que a ativação celular está acompanhada da redução de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), um importante supressor celular, pela ativação do miRNA-22 que também promove a ativação de AKT (LIU *et al.*, 2015; PALACIOS *et al.*, 2015; CHAPMAN *et al.*, 2017). Por meio de uma co-cultura com células de LLC e uma camada de fibroblastos expressando CD154, em comparação com uma cultura controle contendo apenas fibroblastos, ficou clara a importância da estimulação da AKT por CD40 induzindo a sobrevivência celular, uma vez que o CD154 dos fibroblastos foi capaz de ativar CD40 e, conseqüentemente, a AKT (CHAPMAN *et al.*, 2017). Nesse mesmo estudo foi demonstrado, pela primeira vez, que a AKT, via mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e por ativar proteínas de síntese e inibir proteínas de degradação, é peça essencial para o crescimento celular induzido por CD40 (CHAPMAN *et al.*, 2017). Este estudo também demonstrou que a inibição de AKT inibiu a proliferação celular na LLC, mas não inibiu em linfócitos B normais. Os autores sugeriram que tal fato pode ser explicado pelo aumento da estimulação de AKT via indução de CD40+, IL-4 ou IL-21 na LLC quando comparado ao linfócito B normal. Quando testado um novo inibidor seletivo da AKT, o AZD5363 em combinação com Bendamustina, a inibição foi consideravelmente mais eficaz, além de ter promovido maior sensibilidade das

células ao quimioterápico. Do ponto de vista clínico, esse estudo ressaltou a importância de uma combinação de quimioterápicos e inibidores de AKT para aumentar a citorredução (CHAPMAN *et al.*, 2017).

Choudhary e colaboradores (2015), reportaram a importância da combinação de agentes quimioterápicos com inibidores da via de sinalização de AKT. Esses autores evidenciaram que a ativação de AKT levou ao aumento de expressão de Mcl-1 e bcl-xL (proteínas antiapoptóticas), com consequente sequestro de BIM (proteína pró-apoptótica) impedindo a inibição celular por ABT199 (inibidor de bcl-2). Assim, este estudo ressaltou a importância de agentes inibidores da via PI3k/AKT/mTOR em combinação com outras drogas no tratamento de doenças linfoides malignas. Foi demonstrado que o uso do novo inibidor de AKT, o OSU-T315, teve como benefício a ativação da apoptose dependente de caspase pela supressão de BCR, do CD49d e do receptor tipo Toll 9 (TLR-9). In vivo, o novo inibidor promoveu o aumento de sobrevida nos modelos de ratos, indicando que o OSU-T315 tem potencial terapêutico na LLC (LIU *et al.*, 2015), embora novos estudos sejam necessários.

Além disso, Larsen e colaboradores (2017), testaram o MK-2206, também inibidor de AKT, em combinação com Bendamustina e Rituximab, em um estudo de fase I/II, em pacientes com LLC refratária. Neste estudo, o MK-2206 foi administrado em 30 pacientes, uma semana antes dos outros medicamentos, e mostrou taxa de resposta global de 92% e uma mediana de progressão livre da doença e sobrevida livre de tratamento de 16 e 24 meses, respectivamente. Dessa forma, os autores concluíram que o tratamento com o inibidor de AKT combinado com quimioimunoterapia é promissor e merece novos estudos.

Uma súmula dos nossos resultados relacionados à expressão gênica de AKT indica um aumento da expressão desta nos pacientes com LLC quando comparados aos controles. Todavia, vale lembrar que um aumento expressivo e significativo da sua expressão foi observado entre os grupos de Binet, sendo maior no grupo B+C, sugerindo fortemente que a expressão de AKT deve aumentar com o agravamento da doença. Além disso, houve correlação moderada e significativa entre a expressão de AKT com o estadiamento de Binet ( $r=0,584$  e  $p=0,0258$ ). Tais achados ressaltam o papel da AKT na

proliferação celular e na resistência à apoptose, em concordância com os estudos encontrados na literatura. Cabe ressaltar também que, dentre os pacientes de Binet B+C que tiveram expressão elevada deste marcador, uma paciente chamou atenção por apresentar expressão de AKT de 74,25 e também aumento significativo de miR-27a e miR-21, ambos oncogenes, e ainda redução significativa de miR-let-7b, supressor tumoral. Essa mesma paciente apresentou, em seus últimos exames quando comparados aos do dia da coleta, aumento considerável de ureia e creatinina, aumento destoante de LDH (no último exame realizado foi 5137U/L), aumento de bilirrubinas totais, direta e indireta, redução considerável de plaquetas (no último exame realizado foi  $13 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), manteve o número de hemácias e hemoglobina baixos ( $2,2 \times 10^3/\mu\text{L}$  e 6,7g/L, respectivamente) e apresentou redução dos leucócitos totais e de linfócitos (de 98% para 65%) provavelmente em resposta ao tratamento quimioterápico. Um outro paciente com expressão de AKT de 200,53 também apresentou expressão elevada do miR-21. Dessa forma, observa-se que a expressão dos marcadores avaliados no presente estudo pode indicar evolução da doença e agravamento da situação do paciente, uma vez que marcadores de progressão aumentados e um microRNA supressor tumoral reduzido foram observados.

Como já é conhecido, as células da LLC apresentam a sinalização do receptor BCR de forma aberrante, promovendo a ativação da tirosina quinase Bruton kinase (Btk) que é essencial para a ativação de várias vias de sobrevivência celular, como a via AKT, ERK e NF- $\kappa$ B. Com a ativação dessas vias ocorre um aumento da proliferação e sobrevida celular, mecanismo característico da patogênese da LLC (CHENG *et al.*, 2014).

Tendo em vista os achados associando o desempenho da AKT a um papel crítico na sobrevida celular, esta vem se tornando um importante objeto de estudo de mecanismo e potencial alvo terapêutico.

### 6.3 MicroRNAs

Alterações nos miRNAs estão sendo estudadas em muitos tumores, o que motivou a avaliação de alguns destes na presente investigação,

principalmente à luz do conhecimento da capacidade dos miRNAs de modular a expressão gênica. Sabe-se que o ciclo celular, a proliferação celular e, principalmente, as vias de apoptose sofrem forte influência desta modulação, cuja alteração pode afetar vários processos patológicos, particularmente o processo apoptótico dos linfócitos na LLC.

No presente estudo, foram investigados o miR-let-7b, o miR-26a, o miR-21 e o miR-27a em pacientes com LLC e em indivíduos saudáveis. Uma análise dos Gráficos 2 e 3 evidencia uma grande heterogeneidade nos resultados dos miRNAs. Um fato que chama a atenção é o perfil diferente do miR-let-7b e o miR-26a em relação aos outros perfis. Em outras palavras, o miR-let-7b e miR-26a foram mais expressos no grupo dos controles em relação aos pacientes, enquanto miR-21 apresentou uma tendência ao aumento nos pacientes, especialmente no subgrupo B+C. Dessa forma, pode-se aventar a hipótese de que dos miRNAs investigados nesse estudo, o miR-let-7b e o miR-26a possam ser os mais importantes como fator prognóstico desfavorável. No entanto, deve-se avaliar as características individuais objetivando explicar tais achados discrepantes e associação com outros fatores prognósticos.

Uma vasta revisão da literatura não revelou muitos estudos associando diretamente os citados miRNAs com LLC. Dessa forma, será abordada a função específica de cada um dos miRNAs, na tentativa de estabelecer alguma associação entre um tipo especial de miRNA e LLC.

### 6.3.1 Redução da expressão gênica do miR-let-7b nos pacientes com LLC

A família dos miRNAs-let-7 regula funções celulares importantes como a sinalização de sobrevivência, a diferenciação, o controle metabólico e também a utilização de glicose celular. Algumas espécies de let-7 como o let-7a são codificados em diferentes loci do genoma e grande parte deles são de função redundante. As isoformas de let-7 em mamíferos são amplamente distribuídas nos tecidos e exibem regulação temporal, aumentando durante o desenvolvimento e a diferenciação celular. O tempo de expressão do miR-let-7 é determinado tanto de forma transcricional quanto pós transcricional. Os

mecanismos que regulam o miR-let-7 diferem dependendo dos fatores de cada isoforma específica, do estágio de desenvolvimento e do tipo de tecido (REINHART *et al.*, 2000; FROST; OLSON, 2011).

Joshi e colaboradores (2016) reportaram que o miR-let-7a estava diminuído em ratos adultos com oclusão coronariana e também em miócitos ventriculares de camundongos neonatal submetidos à hipóxia. A hipóxia também levou à estimulação da proteína de ligação ao RNA Lin28, um regulador negativo de miR-let-7 que o degrada ou bloqueia, por meio das enzimas drosha ou dicer, inibindo-o. A restauração de miR-let-7 nesses casos possibilitou a ativação e fosforilação de AKT e preveniu a morte celular. A PIK3IP1 (*phosphatidylinositol 3-kinase interacting protein 1*), regulador negativo de PI3K, foi identificada como novo alvo de miR-let-7 (BRIATA *et al.*, 2012; JOSHI *et al.*, 2016).

A expressão do miR-let-7 na maioria dos cânceres humanos incluindo câncer de células tronco é significativamente reduzida. A principal função desse miRNA é a de supressor tumoral (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006). O miR-let-7 se mostrou um regulador direto da expressão de K-ras em células humanas. Um estudo mostrou que no câncer de pulmão a expressão de let-7 estava diminuída enquanto a de K-ras estava aumentada nas células cancerosas e vice-versa em células normais (NAIR; MAEDA; IOANNIDIS, 2012). Nesse mesmo sentido, um outro estudo (APPARI *et al.*, 2014) teve como foco o tratamento de adenocarcinoma pancreático ductal na indução de miR-let-7 com consequente redução de K-ras. Em muitos tipos de câncer a diminuição do miR-let-7 está associada ao pior prognóstico dos pacientes (NAIR; MAEDA; IOANNIDIS, 2012).

Recentemente, Qu e colaboradores (2018) avaliaram a modulação de Lin28B, que participa da promoção e desenvolvimento de tumores humanos por bloquear o miR-let-7, suprimindo-o, e observaram o aumento desse miRNA em células de adenocarcinoma pulmonar. Estes dados sugerem que o Lin28B apresenta potencial para ser foco do tratamento de pacientes com câncer de pulmão com redução de miR-let-7.

Sabe-se que o Lin28 é conhecido por inibir o miR-let-7 e da mesma forma o miR-let-7 pode reprimir a expressão de Lin28. Os dois apresentam

papel importante na diferenciação e no desenvolvimento celular, no entanto, não se sabe muito sobre o efeito deles na hematopoese (GUO; LI; FENG, 2009). Li e colaboradores (2012) mostraram que o Lin28 estava diminuído enquanto o miR-let-7 estava aumentado durante o processo de diferenciação de megacariócitos. Além disso, a interação entre o Lin28 e o let-7 teve impacto na diferenciação dos eritrócitos em células K562 (células leucêmicas). Nesse mesmo estudo, foi reportado pela primeira vez que o Lin28 é alvo do miR-181. Durante a diferenciação de megacariócitos a expressão de miR-181 estava aumentada e pode ter promovido a diferenciação celular por diminuir Lin28 e aumentar let-7. Esses dados sugerem que o Lin28 e o let-7 tem papel importante na diferenciação hematopoiética. No entanto, novos estudos são necessários para esclarecer alguns mecanismos, bem como demonstrar a importância do miR-181 nesse processo (HAGAN; PISKOUNOVA; GREGORY, 2009; LI *et al.*, 2012).

No presente estudo, foi observada diferença significativa entre os pacientes com LLC e controles, sendo a expressão mais elevada no grupo controle para o miR-let-7b. Tal fato sugere associação entre redução de miR-let-7b e pior prognóstico, como encontrado em outros estudos com células cancerígenas. Além disso, o miR-181 tende a estar diminuído e associado ao pior prognóstico nos casos de LLC. Li e colaboradores (2012) sugerem que a redução de miR-181 pode estar relacionada com o aumento de Lin28 e consequente redução de let-7.

Importante notar que um estudo (ADMONI-ELISHA *et al.*, 2016) que buscou novas proteínas relacionadas com LLC demonstrou, pela primeira vez, o aumento da expressão da proteína MAVS (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*), uma proteína mitocondrial que age ligada à VDAC1 (*voltage-dependent anion channel 1*) e modula a atividade de proteínas antiapoptóticas levando à resistência celular à apoptose. Após pesquisa nas bases miR Base e Star Base (mirbase.org; starbase.sysu.edu.cn), bases de dados de miRNAs e seus alvos, foi observado que o miR-let-7b está correlacionado com a MAVS sugerindo que essa proteína possa estar desregulada na LLC pela alteração da modulação desse miRNA.

Sumarizando, os resultados do presente estudo, referentes ao miR-let-7b, podem estar sinalizando para um outro biomarcador com potencial valor

prognóstico desfavorável na LCC, uma vez que a expressão desse miRNA se correlacionou inversamente com o miR-27a, oncogene, e diretamente com o miR-26a, também supressor de tumor. Sabendo-se que o miR-let-7b apresenta função de supressor tumoral, pode-se hipotetizar que uma baixa expressão desse inibidor tumoral possa favorecer a proliferação celular particularmente dos linfócitos. À luz do conhecimento que o miR-let-7b funciona como sinalizador de sobrevida e supressor tumoral, ou seja, pouco expresso em pacientes com vários tipos de câncer, esperar-se-ia de fato uma redução considerável de sua expressão também na LLC.

### 6.3.2 Redução da expressão gênica do miR-26a nos pacientes com LLC

O miR-26 apresenta um papel de supressor tumoral e se mostra importante na regulação da carcinogênese e da progressão tumoral (GAO; LIU, 2011). O papel de supressor tumoral desse miRNA deve-se ao fato de ele agir inibindo a proliferação, induzindo a apoptose celular. No entanto, o miR-26 aparece diminuído em muitos tipos de cânceres. Foi observado uma relação inversa entre o miR-26 e a IL-6, o que sugere que a ação desse miRNA na tumorigênese e na inflamação pode ser pela desregulação dessa interleucina (YANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). Um estudo (CHYI-YING *et al.*, 2016) mostrou que o miR-26 diminuiu a produção de IL-6 e a sinalização de TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B. Dessa forma, os pesquisadores concluíram que a redução do miR-26 levava ao pior prognóstico em pacientes com adenocarcinoma pulmonar.

Um outro estudo (FANGFANG *et al.*, 2017), com células de carcinoma hepatocelular, mostrou que a quimioterapia com doxorrubicina induzia à autofagia porém, diminuía os níveis de miR-26. Mostraram também que o miR-26 tem como alvo a ULK1, um iniciador da autofagia, a nível pós transcricional. Ainda, esse estudo demonstrou, pela primeira vez, que o miR-26 pode promover a apoptose e também sensibilizar as células do carcinoma hepatocelular à quimioterapia suprimindo a expressão de ULK1. Os mesmos autores observaram também que nos casos em que esse miRNA estava diminuído havia considerável resistência à quimioterapia. Concluindo, esses pesquisadores sugeriram, após testes em células, em amostras clínicas e

testes em ratos, que o miR-26 pode ser usado juntamente com a quimioterapia como uma estratégia terapêutica mais eficaz.

Qiu e colaboradores (2017) mostraram que o miR-26 estava diminuído no câncer gástrico e que essa redução estava significativamente associada à baixa sobrevida dos pacientes. A alta expressão do miR-26 levou à supressão da proliferação, migração, invasão e formação de colônias celulares e também induziu à apoptose celular quando comparada aos controles. Dessa forma, esse miRNA se mostrou como um potencial biomarcador de prognóstico independente para a predição de sobrevida em pacientes com câncer gástrico. Em concordância, Jayaraman e colaboradores (2017) também encontraram uma redução do miR-26 em câncer de endométrio.

Sabe-se que a desregulação do c-Myc é uma alteração comum em vários tipos de cânceres, incluindo a LLC. Um estudo (LI *et al.*, 2017) realizado com carcinoma de células escamosas do esôfago, um dos cânceres mais letais do mundo, observou uma relação entre o miR-26 e alterações no c-Myc. Os pesquisadores observaram nos pacientes com esse tipo de tumor uma redução de mais de 50% do miR-26 mesmo em estágios iniciais da doença. Esse miRNA apresentou função de inibidor do crescimento celular e teve como alvo a proteína ligante de MYC (MYCBP) podendo diminuir consideravelmente essa proteína e também os genes alvo de c-MYC neste tipo de tumor. Em suma, o miR-26 pode ser um alvo potencial de prevenção e tratamento do carcinoma de esôfago.

Um outro estudo (CHEN *et al.*, 2017) abordando fibrose da lente ocular e catarata, doenças com transição de epitélio-mesenquimal (EMT), mostrou que o miR-26 apresentou papel importante na inibição da proliferação e migração dessas células, sendo crucial para impedir a progressão da doença. Interessantemente, os investigadores mostraram que esse miRNA age suprimindo a via Jagged-1/Notch, via ativada em doenças do EMT. Dessa forma, doenças fibróticas e também câncer em metástase podem ter o miR-26 e a via de Notch como alvo para o tratamento.

No presente estudo, foram encontradas diferenças significativas na expressão do miR-26a, sendo mais elevada no grupo dos controles em relação aos pacientes com LLC. Também observou-se correlação direta com a

expressão de miR-let-7b, outro supressor tumoral. Pode-se observar que a expressão do miR-26a tende a ser menor que a dos outros miRNAs estudados nesse trabalho, e tende a ser ainda menor nos pacientes em estágio avançado (Binet B+C). Embora não tenham sido encontrados estudos no âmbito das doenças oncohematológicas, faz-se necessária a pesquisa desse miRNA uma vez que ele está envolvido com as vias de Notch, c-Myc e NF- $\kappa$ B, vias conhecidamente alteradas na LLC.

Admoni-Elisha e colaboradores (2016) em seu estudo com novos biomarcadores potenciais na LLC, reportaram algumas novas proteínas que não teriam sido ainda correlacionadas com a doença, dentre essas, a VDAC1. A VDAC1 é uma proteína relacionada ao metabolismo da mitocôndria e interage com as proteínas da apoptose e caspases. Ao que parece, essa proteína é capaz de oferecer sítio de ligação para bcl-2 e bcl-xL, proteínas antiapoptóticas e, além disso, modular o influxo de ATP e glicose promovendo a resistência à morte e proliferação celular. Os níveis de VDAC1 estão altamente correlacionados com o número de células leucêmicas na LLC, segundo esse estudo. As buscas na miR Base e na Star Base ([mirbase.org](http://mirbase.org); [starbase.sysu.edu.cn](http://starbase.sysu.edu.cn)), bases de dados de miRNAs e seus alvos, revelaram que o miR-26a está correlacionado com a VDAC1, podendo talvez essa proteína estar desregulada na LLC pela alteração da modulação desse miRNA.

Extrapolando o exposto acima para o nosso estudo, ao que parece, os níveis de miR-26a já estariam bem baixos logo no início da doença ainda em sua forma indolente (subgrupo A de Binet), o que poderia contribuir para o desenvolvimento da doença, já que este miRNA tem função de supressor tumoral. Sua expressão reduzida favoreceria então a proliferação celular e inibição da apoptose, contribuindo para os achados característicos da doença como linfocitose relativa e absoluta. Pode-se hipotetizar que, o miR-26a, como estratégia terapêutica, poderia teoricamente trazer benefícios ao paciente recém diagnosticado e ainda com doença indolente.

### 6.3.3 Expressão gênica inalterada do miR-21 nos pacientes com LLC

O miR-21 tem, na maioria dos tumores, expressão aumentada e participa de diferentes processos oncogênicos e está associado ao pior prognóstico. Está aumentado no câncer de mama, de pulmão, de cólon, gástrico e pancreático, dentre outros (FU *et al.*, 2011). O miR-21 tem se apresentado aumentado em células B ativadas, especialmente no centro germinativo e em células B de memória. O aumento da expressão desse miRNA pode ser induzido pela IL-4 e CD40L ou mesmo pela estimulação de BCR, o que permite que o linfócito B fique hiperativo e propenso às transformações malignas. Na LLC, o miR-21 se apresenta aumentado, na maioria dos casos, e está relacionado com a resistência à Fludarabina, a baixa sobrevida e o maior risco de progressão da doença (FERRACIN *et al.*, 2010; ROSSI *et al.*, 2010; SALEH *et al.*, 2016).

Carabia e colaboradores (2017) relataram em seu estudo que o estímulo do microambiente, de células de LLC, resultou no aumento da expressão de miR-21 e a redução do mRNA dos seus genes alvos, supressores de tumor PTEN, PDCD4 e PIAS3, pela via de sinalização de ZAP-70, MAPK e transcrição de fator STAT3, o que levou ao aumento da sobrevida celular. A estimulação foi feita com IL-4 e eles também observaram o aumento do miR-2129. Saleh e colaboradores (2016) observaram que o miR-21 estava 10 vezes mais aumentado nas células de LLC quando comparado às células B normais. No entanto, faz-se necessário novos estudos para melhor elucidação dos fatores envolvidos nesses processos e em especial o envolvimento da ZAP-70 na regulação e função do miR-21 na LLC (CARABIA *et al.*, 2017).

Um estudo conduzido por Lu e colaboradores (2017), sobre o papel do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em casos de insuficiência hepática testado em ratos, mostrou que o H<sub>2</sub>S desempenhava um papel protetor nesses casos por ativar o miR-21. Observou-se que o miR-21 foi capaz de diminuir a expressão de PTEN e conseqüentemente aumentar a expressão de AKT. O miR-21 também se destacou em um outro estudo (TOLDO *et al.*, 2014) onde foi estimulado por H<sub>2</sub>S exógeno e foi importante por limitar a injúria cardíaca em casos de isquemia, por seu efeito protetor em órgãos e células e seu papel anti-inflamatório. Diversos estudos demonstraram que a AKT apresenta papel antiapoptótico levando à redução da ativação da caspase 9 e também diminuiu a ativação de citocinas próinflamatórias, tendo um papel importante na

manutenção celular contra a injúria hepática (MULLONKAL; TOLEDO-PEREYRA, 2007; TOLDO *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2017).

Alguns estudos vêm reportando também um papel importante do miR-21 em doenças inflamatórias e autoimunes. Nas células T foi encontrada expressão elevada do miR-21, estando associado ao lúpus eritematoso, esclerose múltipla e psoríase, dentre outras doenças (GARCHOW *et al.*, 2011). As células B tem um papel essencial no controle das respostas imunes; produção de anticorpos, apresentação de antígeno e na produção e estimulação da via das citocinas. Assim, os linfócitos B reguladores produzem IL-10 e inibem a autoimunidade e a rejeição aos transplantes, e promovem o crescimento tumoral (MAURI; MENON, 2015). Wang e colaboradores (2017) mostraram, pela primeira vez, que a IL-10 é alvo do miR-21 e que este miRNA é capaz de regular negativamente o desenvolvimento das células B reguladoras e está associado com o desenvolvimento de doenças autoimunes.

Embora não tenham sido encontradas em nosso estudo diferenças significativas na expressão de miR-21 entre os grupos, observa-se um aumento discreto, especialmente nos pacientes Binet B+C. Ressalta-se que uma paciente Binet B+C teve expressão de 145,48 desse miRNA e também apresentou aumento do miR-27a, outro oncogene, e redução de miR-26a, supressor de tumor. Outro paciente do grupo de Binet A apresentou expressão elevada de miR-21 de 144,76 e também o aumento de miR-27a. Esses resultados sugerem que se este paciente está propenso a uma evolução mais rápida da doença. Supõe-se que esse miRNA evolua com o agravamento da doença por seu papel oncogênico, além de se destacar por sua relação com AKT que também se mostrou aumentada nos pacientes com LLC desse estudo, caracterizando a resistência à apoptose. Talvez o baixo número de amostras ensaiadas e devido ao maior número de pacientes pertencerem ao grupo de Binet A possam justificar o fato de não termos encontrado diferenças significativas para este miRNA.

#### 6.3.4 Expressão gênica inalterada do miR-27a nos pacientes com LLC

O miR-27 está localizado no cromossomo 19 e está alterado em vários tipos de câncer como câncer de cólon, mama, osteossarcoma e

adenocarcinoma gástrico podendo atuar como oncogene ou como supressor de tumor (MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2007).

Um estudo desenvolvido por Li e colaboradores (2016) avaliou a função do miR-27 no carcinoma de células renais e mostrou que esse miRNA está relacionado com a supressão da proliferação celular e com a indução à apoptose celular, sugerindo que o miR-27 tenha a ação de supressor tumoral nesse tipo de câncer. Os dados desse estudo mostraram que a ação de supressor tumoral desse miRNA se deve ao fato do receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR) aparecer como um novo alvo do miR-27. Logo, houve uma desregulação do ciclo celular causado pela inibição de EGFR.

Já um outro estudo (LIU *et al.*, 2009) envolvendo o miR-27 no adenocarcinoma gástrico, relatou que esse miRNA apresentou perfil oncogênico induzindo o crescimento celular tendo como alvo a proteína proibitina (proteína associada à mitocôndria no citoplasma que pode agir como inibidor de fatores de transcrição no núcleo). Ao que parece, essa proteína apresenta um sítio específico de ligação para o miR-27 e é inibida por esse miRNA. Assim, esses pesquisadores suportaram a ideia de que o miR-27 pode funcionar como um oncogene.

Nesse mesmo sentido, no câncer de mama, o miR-27 também apresentou papel de oncogene e agiu ativando cofatores transcricionais e ZBTB10 (*zinc finger and BTB domain containing 10*). É sabido que a ZBTB10 apresenta a função de suprimir a transcrição do fator da proteína de especificidade 1 (SP1) que está aumentada em vários cânceres (LI *et al.*, 2010). Assim, o estudo desenvolvido por Vimalraj e colaboradores (2013) mostrou que no câncer de mama a ZBTB10 está reduzida e que o miR-27 foi capaz de aumentar a expressão de SP1, levando à proliferação celular.

Um outro estudo desenvolvido por Salah e colaboradores (2015), reportou que o miR-27 estava aumentado no osteossarcoma e promoveu a formação de metástases pulmonar, suportando a ideia de que esse miRNA tenha função de promotor de metástases. Igualmente, Jones e colaboradores (2012) também encontraram metástases pulmonares, e ainda nos ossos, pernas e antebraço, em um estudo com osteossarcoma e aumento da expressão de miR-27.

O CDODA-Me é um agente anticâncer que foi testado em células de câncer de cólon por um grupo de pesquisadores (CHINTHARLAPALLI *et al.*, 2009) que reportaram uma redução significativa no tamanho do tumor e acompanhado de redução significativa de miR-27. A diminuição da expressão de miR-27 levou ao aumento de ZBTB10 inibindo a proliferação das células, sugerindo que esse agente representa um dos primeiros exemplos de agentes que interagem com miRNAs levando à inibição do crescimento tumoral.

Em outra linha de estudo, Cho e colaboradores (2016), relataram que o miR-27 tem papel regulador no desenvolvimento de células T reguladoras podendo provocar tolerância imunológica, desregulação da resposta Th1 e desenvolver doenças autoimunes. Um dos alvos do miR-27 nesse mecanismo é o GATA3, fazendo com que esse miRNA tenha um papel negativo na regulação da imunidade via Th2 também.

No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de miR-27a quando comparados os pacientes e controles ou quando separados os subgrupos de Binet, provavelmente pelo número limitado de amostras ensaiadas. Dessa forma, nossos dados, à princípio, não permitem inferir se o miR-27a funciona como supressor de tumor ou oncogene. No entanto, pode-se observar uma tendência ao aumento da expressão desse miRNA nos pacientes Binet B+C em relação aos pacientes Binet A. Cabe ressaltar que foi encontrada no nosso estudo uma correlação inversa entre a expressão de miR-27a e o miR-let-7b e correlações diretas com o miR-21, oncogene, e a beta2-microglobulina; uma proteína que aumenta com o agravamento da LLC, está presente na superfície de quase todas as células do organismo e é bastante avaliada no exame de sangue desses pacientes. Cabe destacar ainda que uma paciente com expressão elevada de miR-27a (687,9), apresentou também aumento significativo de AKT e redução significativa de miR-let-7b, chamando atenção para a possível relação entre esses biomarcadores. O acompanhamento deste paciente seria bastante pertinente considerando a possibilidade de evolução mais rápida da doença. Esta paciente teve aumento de ureia e de creatinina, quando comparados os exames da coleta com os atuais, teve redução do número de hemácias e hemoglobina e também dos leucócitos totais e linfócitos, provavelmente pelo uso de quimioterápicos. Em outras palavras, uma alta expressão do miR-27a

poderia sinalizar para o agravamento da doença. Embora não tenham sido encontrados estudos focando nas doenças hematológicas, sugere-se que o miR-27a também tenha um papel de oncogene na LLC.

Um mesmo miRNA pode ter papel oncogênico ou de supressor tumoral dependendo do tipo celular acometido e isso talvez possa explicar a diferença da expressão do miR-27a em diferentes tipos de tumor, diferentes tipos celulares e diferentes alvos. Os dados obtidos no presente estudo, ou seja, discreto aumento nos controles e com tendência ao aumento no subgrupo B+C, remete à ideia de que o miR-27a estaria implicado na oncogênese favorecendo a proliferação celular e o mecanismo antiapoptótico.

De acordo com a pesquisa na miR Base e na Star Base (mirbase.org; starbase.sysu.edu.cn), bancos de dados de miRNAs e seus alvos, foi observado que o miR-27a, assim como o miR-let-7b, também estão associados com a proteína MAVS. Essa proteína foi estudada por Admoni-Elisha e colaboradores (2016) que reportaram pela primeira vez, seu aumento na LLC e sua relação com a resistência à apoptose celular. Extrapolando para o nosso estudo a relação dos miRNAs, miR-27a e miR-let-7b já correlacionados inversamente, com a proteína MAVS e, uma vez tendo sido relatado o aumento desta última na LCC, pode-se sugerir uma associação entre aumento de miR-27a, a diminuição do miR-let-7b e a resistência à apoptose celular. Tendo em vista que alguns pacientes se destacaram com um aumento destoante do miR-27a reforça-se a ideia de que este miRNA poderia exercer alguma influência sobre a progressão da doença e seria de bom alvitre acompanhar esses pacientes, especialmente os de Binet A, uma vez que poderiam evoluir mais rapidamente.

#### 6.4 Avaliação dos níveis plasmáticos de Interleucina-4

A IL-4 vem sendo relacionada com a LLC e alguns estudos, já citados neste trabalho, sugerem que esta tenha um papel importante na proliferação celular e progressão da leucemia. Sabe-se que as células T interagem com os linfócitos B leucêmicos nos linfonodos, nos centros de proliferação dessas células, sugerindo então que as células leucêmicas na LLC sejam estimuladas nesses locais pela IL-4 através da estimulação de BCR. Em um estudo,

desenvolvido por Guo e colaboradores (2016), foi descrito o papel da IL-4 na estimulação da proteína CD79b, aumentando a expressão de sIgM e levando à maior ativação de BCR. Este estudo reportou também que no sangue periférico de pacientes com LLC a concentração de IL-4 é muito reduzida, sugerindo com isso a redução também observada da proteína CD79b. Ainda que esse mecanismo não seja muito bem descrito, os autores acima sugerem que as células leucêmicas que recém saíram dos linfonodos para a corrente sanguínea expressem mais sIgM que aquelas que saíram há mais tempo.

Aguilar-Hernandez e colaboradores (2016) reportaram que a IL-4 age mais nas células malignas da LLC, nos linfonodos, quando comparada à sua ação no sangue periférico e na medula óssea. Esses pesquisadores também mostraram que as células T foram mais observadas nos linfonodos na LLC. Com base nos estudos acima, é possível sugerir que a redução observada nos níveis plasmáticos de IL-4 em nossos pacientes com LLC pode ser justificada pela dosagem dessa interleucina ter sido feita no plasma e não em amostras coletadas dos linfonodos, onde a presença dos linfócitos T e a expressão de IL-4 são mais significativas. Pela facilidade de obtenção de amostras de sangue, justifica-se a avaliação de IL-4 em amostras plasmáticas. Dois casos de LLC apresentaram níveis elevados de IL-4, mostrando uma heterogeneidade de resultados e requerendo uma investigação adicional nestes pacientes, em busca de uma possível explicação para o fato.

Lafuente e colaboradores (2015), mostraram que a IL-4 é capaz de regular positivamente o miR-21 e contribuir assim para a resistência das células leucêmicas da LLC à apoptose. Mas como em nosso estudo não houve um aumento de IL-4, justifica-se em parte o fato da não observância de alterações significativas no miR-21. Pode-se sugerir também que os nossos resultados possam ser explicados pelo fato de haver uma redução e alteração na função das células T na LLC. Ramsay e colaboradores (2008) reportaram que as células T dos pacientes com LLC apresentam a capacidade de proliferação e função citotóxica prejudicadas. Junevik e colaboradores (2006) também relataram que as células T na LLC apresentavam receptores inibitórios de células NK levando à alteração na sua função antitumoral. Nessa mesma linha de pesquisa, um outro estudo também mostrou que as células T na LLC

foram incapazes de começar, manter e completar sua resposta imune contra as células B leucêmicas (SCRIVENER *et al.*, 2003).

Um estudo desenvolvido por Hill e colaboradores (1999) reportaram uma redução significativa no número de células T do tipo CD7/CD4 na LLC desde os estágios iniciais não alterando ao longo da evolução da doença. Essas células eram menos de 1% do total de linfócitos nos pacientes que possuíam uma grande quantidade de células B leucêmicas CD5+. Esse estudo também encontrou uma redução de IL-4 e IFN- $\gamma$  nos pacientes com LLC mostrando uma deficiência tanto humoral quanto celular nesses pacientes. Assim, sugere-se que as células B na LLC possam ser de certa forma independentes da ação das citocinas, podendo proliferar por outras vias de sinalização. Todavia, para melhor esclarecer esses mecanismos, faz-se necessário mais estudos sobre o papel da IL-4 sobre os linfócitos B do sangue periférico.

Groneberg e colaboradores (2003) mostraram níveis elevados de CD95 (Fas/Apo-1) nas células T da LLC correlacionando com a redução do tempo de duplicação dos linfócitos, evolução no estadiamento de Binet e resistência ao tratamento quimioterápico. Além disso, a presença desse marcador nas células T foi associado à redução de sobrevida livre da doença e também à redução da taxa de sobrevida dos pacientes. Isso mostra que pode haver outros estímulos advindos dos linfócitos T no sangue periférico, além da IL-4, que estimulem a progressão da LLC.

No presente estudo foi observada uma redução significativa da concentração plasmática da IL-4 nos pacientes quando comparada aos controles, o que pode ser justificado tanto pela redução de linfócitos T no sangue periférico, quadro característico apresentado por pacientes com LLC, quanto pela possível disfunção dessas células ou mesmo por elas estarem estimulando as células B leucêmicas por outros mecanismos. Ainda pode-se justificar os nossos resultados pelo fato da dosagem de IL-4 não ter sido nos linfonodos, local onde ela está em maior quantidade. Apesar disso, dois pacientes Binet B+C se destacaram com valores altos na dosagem de IL-4, um deles com 695,74 pg/mL e também com redução significativa de miR-let-7b; e outro com dosagem de 825,37 pg/mL e com redução significativa de miR-26a, sugerindo relação com dois miRNAs supressores de tumor.

## 6.5 Limitações do estudo

São consideradas limitações desse estudo o número baixo de indivíduos participantes do estudo, a forma de dosagem da IL-4 no plasma e não nos linfonodos e a falta de dados clínicos e laboratoriais completos no Serviço de Hematologia, local de recrutamento dos pacientes com LLC.

Uma outra importante limitação consiste no tempo exíguo para o recrutamento de pacientes, realização de experimentos e defesa da tese, enfim para a conclusão do Doutorado. Dessa forma, é impossível o acompanhamento dos pacientes que apresentaram aumento da expressão da AKT e redução de miRNA-let-7b e miRNA-26a, o que possivelmente agregaria valor aos resultados observados no presente estudo, particularmente no que se refere ao prognóstico daqueles pacientes situados no subgrupo A de Binet.

## 6.6 Considerações finais

É desejável o acompanhamento dos pacientes com maior gravidade (B+C de Binet), a fim de se determinar a taxa de sobrevida daqueles com perfil desfavorável. Este teria como base os biomarcadores do presente estudo, aliados aos já comprovadamente de importância prognóstica como certas alterações cromossômicas, ZAP-70, CD38, estado mutacional da IgVH e outros, além dos parâmetros convencionais utilizados na classificação de estadiamento de Binet, tais como taxa de hemoglobina e contagens de leucócitos totais, linfócitos e plaquetas. Particularmente, seria muito importante acompanhar os pacientes do subgrupo A de Binet, com foco para aqueles que embora ainda estejam com a doença indolente, já apresentam biomarcadores desfavoráveis, tais como aumento da expressão de AKT, de miR-27a e miR-21, e baixa expressão de miR-let-7b e miR-26a na tentativa de identificar aqueles com maior risco de pior evolução da doença, os quais deverão ser acompanhados longitudinalmente. Tais estudos posteriores do nosso grupo

deverão ter como prioridade a validação dos atuais dados na expectativa de se obter novos biomarcadores de prognóstico e alvos terapêuticos.

Esforços serão envidados, nos próximos estudos do nosso grupo de pesquisa, para a investigação de possíveis interações dos biomarcadores ora focados com outros agentes que promovem proliferação celular ou inibição do crescimento tumoral.

É pertinente mencionar que o presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa iniciada há poucos anos no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, que visa produzir conhecimentos com foco em neoplasias hematológicas. Além de publicações e de trabalhos apresentados em congressos oriundos desta linha, esta conta com parcerias dentro e fora dos muros da UFMG, já foi objeto de aprovação de projetos por órgãos fomentadores de pesquisa no país e já contribuiu para a formação de três mestres, dois doutores e introdução à pesquisa de vários alunos de graduação voluntários ou bolsistas de iniciação científica.

À luz da existência de um grupo que pretende continuar estudando neoplasias hematológicas, há crescente expectativa que o conhecimento na área possa atingir patamares superiores, principalmente aquele voltado ao prognóstico de tais doenças com potencial para impactar positivamente a terapêutica e, dessa forma, facilitar sua individualização.

## 7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitem concluir que:

- O aumento na expressão de mRNA da AKT nos pacientes estudados corrobora com o aumento da proliferação e sobrevida celular, e é de grande importância na patogênese da doença.
- A redução significativa do miR-let-7b e do miR-26a, ambos supressores de tumor, provavelmente contribui para a sobrevida celular e manutenção da doença.
- A redução da IL-4 nos pacientes, em comparação aos controles, pode ser atribuída à redução de linfócitos T nesses pacientes e também às limitações deste estudo como a quantificação da IL-4 no plasma e não em linfonodos.
- Os pacientes que possuem biomarcadores correlacionados entre si devem receber atenção especial pois podem evoluir mais rapidamente e de forma mais agressiva por ter um fator prognóstico mais desfavorável.

## REFERÊNCIAS

ADMONI-ELISHA, L. *et al.* Novel Biomarker Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia: Impact on Diagnosis, Prognosis and Treatment. **PLoS One**, v.11, p. e0148500, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0148500.

AGUILAR-HERNANDEZ, M.M. *et al.* IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells. **Blood**, v. 127, p. 3015-25, 2016. doi: 10.1182/blood-2015-11-682906.

ALLEN, J.C. *et al.* c-Abl regulates Mcl-1 gene expression in chronic lymphocytic leukemia cells. **Journal Blood**, v. 117, p. 2414-22, Out. 2014.

AMBROS, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. **RNA**, v. 9, p. 277-279, 2003. doi:10.1261/rna.2183803.

APPARI, M. *et al.* Sulforaphane, quercetin and catechins complement each other in elimination of advanced pancreatic cancer by miR-let-7 induction and K-ras inhibition. **International Journal of Oncology**, v. 45, p.1391-1400, 2014.

BALATTI, V. *et al.* Role of microRNA in chronic lymphocytic leukemia onset and progression. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 8, p. 12, 2015.

BALATTI, V. *et al.* TCL1 targeting miR-3676 is codeleted with tumor protein p53 in chronic lymphocytic leukemia. **PNAS**, v. 112, p. 2169-74, jan. 2015. Disponível em <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas>>.

BARRAGAN, M. *et al.* Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v. 99, p. 2969-2976, 2002.

BRIATA, P. *et al.* PI3K/AKT signaling determines a dynamic switch between distinct KSRP functions favoring skeletal myogenesis. **Cell Death Differ.**, v. 19, p. 478–487, 2012.

BUDAK, H. *et al.* MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. **Briefings in Functional Genomics**, v. 15, p. 65-71, 2016

BURGER, J.A. *et al.* Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell derived factor-1. **Blood**, v. 96, p. 2655-2663, 2000.

BYRD, J.C. *et al.* Entering the era of targeted for chronic lymphocytic leukemia: impact on the practicing clinician. **J. Clin. Oncol.**, v. 32, p. 3039–3047, 2014.

CARABIA, J. *et al.* Microenvironment regulates the expression of miR-21 and tumor suppressor genes PTEN, PIAS3 and PDCD4 through ZAP-70 in chronic lymphocytic leucemia. **Scientific Reports**, v. 7, p. 12262, 2017. doi:10.1038/s41598-017-12135-7

CARDONE, M.H. *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, v. 282, p. 1318-1321, 1998.

CHAPMAN, E.A. *et al.* Delineating the distinct role of AKT in mediating cell survival and proliferation induced by CD154 and IL-4/IL-21 in chronic lymphocytic leukemia. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p. 102948-102964, 2017.

CHAVEZ, J.C; SAHAKIAN, E.; PINILLA-IBARZ, J. Ibrutinib: an evidence-based review of its potential in the treatment of advanced chronic lymphocytic leukemia. **Core Evid.**, v. 8, p. 37-45, 2013. doi: 10.2147/CE.S34068.

CHEN, X. *et al.* MicroRNA-21 Contributes to Liver Regeneration by Targeting PTEN. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 22, p. 83-91, 2016.

CHEN, X. *et al.* MicroRNA-26a and -26b inhibit lens fibrosis and cataract by negatively regulating Jagged-1/Notch signaling pathway. **Cell Death Differ.**, v. 24, p. 1431-1442, 2017. doi: 10.1038/cdd.2016.152.

CHENG, S. *et al.* BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. **Leukemia**, v. 28, p. 649–657, 2014.

CHIATTONE, C.S.; FALCÃO, R.P. Leucemia linfóide crônica: nova visão de uma velha doença. **Rev. Bras. Hemat. Hemot.**, v. 27, p. 227-8, 2005.

CHINTHARLAPALLI, S. *et al.* Oncogenic MicroRNA-27a Is A Target For Anticancer Agent Methyl 2-Cyano-3,11-dioxo-18 $\beta$ -olean-1,12-dien-30-oate in Colon Cancer Cells. **Int J Cancer**. v. 125, p. 1965–1974, 2009. doi: 10.1002/ijc.24530

CHYI-YING, A. *et al.* MiR-26 down-regulates TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signalling and IL-6 expression by silencing HMGA1 and MALT1. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 3772-3787, 2016.

CHO, S. *et al.* miR-23~27~24 clusters control effector T cell differentiation and function. **J Exp Med.**, v. 213, p. 235–249, 2016.

CHOUHARY, G.S. *et al.* MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/ AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. **Cell Death and Disease**, v. 6, p. e1593, 2015.

CORSINI, L.R. *et al.* The role of microRNAs in cancer: diagnostic and prognostic biomarkers and targets of therapies. **Expert. Opin. Ther. Targets.**, v. 16, p. S103-9, 2012. doi:10.1517/14728222.2011.650632

CUELLAR, T.L.; MCMANUS, M.T. MicroRNAs and endocrine biology. **J. Endocrinol.**, v. 187, n. 3, p. 327-32, 2005.

DANILOV, A.V. Targeted therapy in chronic lymphocytic leukemia: past, present, and future. **Clin. Ther.**, v. 35, p. 1258-1270, 2013.

DATTA, S.R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell intrinsic death machinery. **Cell.**, v. 91, p. 231-241, 1997.

DIGHIERO, G. CLL biology and prognosis. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, p. 278-284, 2005.

DOUGLAS, R.S. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. **Blood**, v. 89, p. 941–947, 1997.

DREGER, P. The Evolving Role of Stem Cell Transplantation in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 27, p. 355-369, 2013.

DYER, M.J. *et al.* BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. **Blood**, v. 83, n. 12, p. 3682-8, Jun. 1994.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 259-269, 2006.

FANGFANG, J. *et al.* MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy. **Cell Death and Disease**, v.8, p. e2540, 2017. doi:10.1038/cddis.2016.461

FERRACIN, M. *et al.* MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. **Mol. Cancer**, v. 9, p.123, 2010.

FERRAJOLI, A. *et al.* Epstein–Barr Virus MicroRNAs are Expressed in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Correlate with Overall Survival. **EBioMedicine**, v. 2, p. 572-82. Abril 2015. Disponível em <<http://www.ebiomedicine.com>

FILHO, J.C.M.R.; KIMURA, E.T. MicroRNAs: Nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arq. Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 6, p. 1102-1107, Dez. 2006.

FOERSTER, J. *et al.* Elderly high NK responders are characterized by intensive proliferative response to PHA and Con A and optimal health status. **Arch Gerontol Geriatr.**, v. 16, n. 3, p. 199-205, Maio/Jun. 1993.

FROST, R.J.; OLSON, E.N. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.108, p. 21075–21080, 2011.

FU, X. *et al.* Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 41, p. 1245–1253, 2011.

FURMAN, R.R. *et al.* Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. **J Immunol.**, v. 164, p. 2200-2206, 2000.

GAO, J.; LIU, Q.C. The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review). **Oncol. Lett.**, v. 2, p. 1019–1023, 2011.

GARCHOW, B.G. *et al.* Silencing of microRNA-21 *in vivo* ameliorates autoimmune splenomegaly in lupus mice. **EMBO Molecular Medicine**, v 3, p. 605–615, 2011.

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, p. 1755-64, 2010.

GOMES, L.C. *et al.* Advances in chronic lymphocytic leukemia pharmacotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 349–358, 2018.

GONÇALVES, R.P. *et al.* Evaluation of the hematologic profile of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL-B) at a state hemocenter. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, p. 228-234, 2009.

GORDIENKO, I. *et al.* The interplay of CD150 and CD180 receptor pathways contribute to the pathobiology of chronic lymphocytic leukemia B cells by selective inhibition of Akt and MAPK signaling. **Plos One**, v. 12, p. e0185940, Oct. 2017.

GRONEBERG, C. *et al.* Clinical relevance of CD95 (Fas/Apo-1) on T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Exp Hematol.**, v. 31, p. 682-5, 2003.

GRUMONT, R.J. *et al.* B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. **J Exp Med.**, v. 187, p. 663-674, 1998.

GRUMONT, R.J.; ROURKE, I.J.; GERONDAKIS, S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation induced apoptosis. **Genes Dev.**, v. 13, p. 400-411, 1999.

GUO, B. *et al.* IL-4 rescues surface IgM expression in chronic lymphocytic leucemia. **Blood**, v. 128, p. 553-62, 2016. doi: 10.1182/blood-2015-11-682997.

GUO, J.; LI, Z.C.; FENG, Y.H. Expression and activation of the reprogramming transcription factors. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 390, p. 1081–1086, 2009.

HAGAN, J.P.; PISKOUNOVA, E.; GREGORY, R.I. Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 16, p. 1021–1025, 2009.

HILL, S.J. *et al.* Reduced IL-4 and Interferon-Gamma (IFN- $\Gamma$ ) Expression by CD4 T Cells in Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 117, p. 8-11, 1999.

HOFFBRAND, A. V. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed., Porto Alegre: Artmed, 2013.

JAYARAMAN, M. *et al.* Identification of novel diagnostic and prognostic miRNA signatures in endometrial cancer. **Genes Cancer**, v. 8, p. 566-576, 2017. doi: 10.18632/genesandcancer.

JONES D.T. *et al.* Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis. **Blood**, v. 101, p. 3174-3180, 2003.

JONES, K.B. *et al.* MicroRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. **Cancer Res.**, v. 72, p. 1865–1877, 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2663

JOSHI, S. *et al.* A cardiac myocyte-restricted Lin28/let7 regulatory axis promotes hypoxia-mediated apoptosis by inducing the AKT signaling suppressor PIK3IP1. **Biochim Biophys Acta**, v.1862, p. 240–251, 2016.

JUNEVIK, K. *et al.* The expression of NK cell inhibitory receptors on cytotoxic T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). **Ann Hematol.**, v. 86, p. 89-94, 2007.

KIKUSHIGE, Y. *et al.* Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Cell**, v. 20, p. 246-259, 2010.

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, p. 28-40, 2010.

LAFUENTE, N.R. *et al.* IL-4 Up-Regulates MiR-21 and the MiRNAs Hosted in the CLCN5 Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Plos one**, v.10, p. e0124936, Abril, 2015.

LARSEN, J.T. *et al.* Akt inhibitor MK-2206 in combination with Bendamustine and Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Results from the N1087 Alliance Study. **American Journal of Hematology**, v. 92, p. 759–763, 2017.

LI, J. *et al.* miR-26a and miR-26b inhibit esophageal squamous cancer cell proliferation through suppression of c-MYC pathway. **Gene**, v. 625, p. 1-9, 2017. doi: 10.1016/j.gene.2017.05.001.

LI, Y. *et al.* MicroRNA-27a functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by targeting epidermal growth factor receptor. **Oncology Letters**, v. 11, p. 4217-4223, 2016.

LI, X. *et al.* MicroRNA-27a indirectly regulates estrogen receptor  $\alpha$  expression and hormone responsiveness in MCF-7 breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 151, p. 2462–2473, 2010.

LI, X. *et al.* MiR-181 Mediates Cell Differentiation by Interrupting the Lin28 and Let-7 Feedback Circuit. **Cell Death and Differentiation**, v.19, p. 378–386, 2012.

LIU, T. *et al.* MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. **Cancer Lett.**, v. 273, p. 233-42, 2009. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.003.

LIU, T-M. *et al.* OSU-T315: A Novel Targeted Therapeutic That Antagonizes AKT Membrane Localization and Activation of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. **Blood**, v. 125, p. 284–295, 2015.

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. **Blood**, v. 111, n. 2, p. 846-55, 2007.

LU, M. *et al.* MicroRNA-21-regulated activation of the Akt pathway participates in the protective effects of H<sub>2</sub>S against liver ischemia-reperfusion injury. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 41, p. 229-238, 2017. doi:10.1248/bpb.b17-00769

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

MAURI, C.; MENON, M. The expanding family of regulatory B cells. **Int Immunol.**, v. 27, p. 479-86, 2015.

MENDOZA, M.C.; ER, E.E.; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends Biochem Sci.**, v. 36, p. 320–8, 2011.

MERTENS-TALCOTT, S.U. *et al.* The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 67, p. 11001-11011, 2007.

MIRBASE: disponível em <http://mirbase.org/>. Acessado em: out de 2016.

MONROIG, P.C.; CALIN, G.A. MicroRNA and Epigenetics: Diagnostic and Therapeutic Opportunities. **Curr. Pathobiol.**, v. 1, p. 43-52, 2013.

MULLONKAL, C.J.; TOLEDO-PEREYRA, L.H. Akt in ischemia and reperfusion. **Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research**, v. 20, p. 195-203, 2007.

NAIR, V.S.; MAEDA, L.S.; IOANNIDIS, J.P. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. **J Natl Cancer Inst**, v. 104, p. 528-540, 2012.

OKADA, H.; BANCHEREAU, J.; LOTZE, M.T. Interleukin-4. **The Cytokine Handbook**, London: Academic Press, v. 1, p. 227–262, 2003.

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. 441-9, 2005.

PALACIOS, F. *et al.* Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. **Leukemia**, v. 29, p. 115-125, 2015.

PALOMBA, M.L. *et al.* Multidimensional single-cell analysis of BCR signaling reveals proximal activation defect as a hallmark of chronic lymphocytic leukemia B cells. **PLoS One**, v. 9, p. 79987, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0079987

PETERS, R.; LEYRAZ, S.; PEREY, L. Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursors. **Blood**, v. 92, p. 2041-2052, 1998.

POGUE, S.L. *et al.* B cell antigen receptor-induced activation of Akt promotes B cell survival and is dependent on Syk kinase. **J Immunol.**, v. 165, p. 1300-1306, 2000.

QIU, X. *et al.* Expression and prognostic value of microRNA-26a and microRNA-148a in gastric cancer. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 32, p. 819-827, 2017. doi: 10.1111/jgh.13533.

QU, T.T. *et al.* PCAF-mediated acetylation of Lin28B increases let-7 biogenesis in lung adenocarcinoma H1299 cells. **BMC Cancer**, v. 18, p. 27, 2018. doi: 10.1186/s12885-017-3959-0.

RAMSAY, A.G. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. **J Clin Invest.**, v. 118, p. 2427-2437, 2008.

REINHART, B.J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, p. 901–906, 2000.

RINGSHAUSEN, I. *et al.* Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase C delta. **Blood**, v. 100, p. 3741-3748, 2002.

ROBAK, T. Inhibitors of B-Cell receptor signaling for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. **J. Leuk.**, v. 1, p. 101, 2013.

RODRÍGUEZ-VICENTE, A.E.; DÍAZ, M.G.; HERNANDEZ-RIVAS, J.M. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. **Cancer Genet.**, v. 206, p. 49, 2013.

ROSSI, S. *et al.* microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. **Blood**, v. 116, p. 945–952, 2010.

SÁCHEZ-VISCAÍNO, J.M. Cell collaboration in the immune response. Primary and secondary responses. **Course of introduction to the swine immunology**. Disponível em: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun/tercero2.htm>. Acesso em: 11 dez. 2017.

SAIJO, K. *et al.* Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the kappaB kinase alpha. **J Exp Med.**, v. 195, p. 1647-1652, 2002.

SALAH, Z. *et al.* miR-27a and miR-27a\* contribute to metastatic properties of osteosarcoma cells. **Oncotarget**, v. 6, p. 4920-4935, 2015. doi: 10.18632/oncotarget.3025

SALEH, L. M. *et al.* Ibrutinib downregulates a subset of miRNA leading to upregulation of tumor suppressors and inhibition of cell proliferation in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 31, p. 340-349, 2016.

SCRIVENER, S. *et al.* Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Leuk Lymphoma**, v. 44, p. 383-9, 2003.

SERRANO, R.; THEODORO, T.R.; PINHAL, M.A.S. Oncogenes, genes supressores de tumores, microRNAs e o desenvolvimento de tumores. **RBM**, v. 71, p. 4-10, Jul. 2014.

SHAHJAHANI, M. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. **Cel. Oncol.**, v. 38, p. 93-109, 2015. doi:10.1007/s13402-014-0215-3

SINGH, S.P. *et al.* Cell lines generated from a chronic lymphocytic leukemia mouse model exhibit constitutive Btk and Akt signaling. **Ocotarget**, v. 8, p.71981-71995, 2017.

STAMATOPOULOS, Basile. *et al.* Opposite Prognostic Significance of Cellular and Serum Circulating MicroRNA-150 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. **Molecular medicine**, v 21, p. 123-133, 2015.

STARBASE: disponível em <http://starbase.sysu.edu.cn>. Acessado em: out de 2016.

STEELE, A.J. *et al.* The JAK3-selective inhibitor PF-956980 reverses the resistance to cytotoxic agents induced by interleukin-4 treatment of chronic lymphocytic leukemia cells: potential for reversal of cytoprotection by the microenvironment. **Blood**, v. 116, p. 4569-4577, 2010.

STEPHENS, D.M. *et al.* Impact of targeted therapy on outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with relapsed Del(17p13.1) karyotype at a single center. **Leukemia**, v. 28, p. 1365-8, 2014. doi: 10.1038/leu.2014.42

TOLDO, S. *et al.* Induction of microRNA-21 with exogenous hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemic and inflammatory injury in mice. **Circulation. Cardiovascular genetics**, v. 7, p. 311-320, 2014.

VARGAS, M. M.; MOREIRA, R. S. Aplicação de microRNAs na prática clínica. **Revista Brasileira Clínica Médica**, São Paulo, 2013.

VIMALRAJ, S. *et al.* Regulation of Breast Cancer and Bone Metastasis by MicroRNAs. **Dis Markers**, v. 35, p. 369-387, 2013. doi: 10.1155/2013/451248

VYAS, N.; HASSAN, A. Recent advances in chronic lymphocytic leukemia. **Indian J. Cancer**, v. 49, p. 137-43, 2012. doi: 10.4103/0019-509X.98940

WANG, R. *et al.* miR-21 silencing ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting the differentiation of IL-10producing B cells. **Oncotarget**, v. 8, p. 94069-94079, 2017.

WILLIMOTT, S. *et al.* Cap-translation inhibitor, 4EGI-1, restores sensitivity to ABT-737 apoptosis through cap-dependent and-independent mechanisms in chronic lymphocytic leukemia. **Clin. Cancer Res.**, v. 19, p. 3212-3223, 2013.

YANG, X. *et al.* MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway. **Hepatology**, v. 58, p. 158–170, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* IL-6 upregulation contributes to the reduction of miR-26a expression in hepatocellular carcinoma cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 46, p. 36-38, 2013.

## ANEXO I – 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  
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia - UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de julho de 2016, a emenda abaixo relacionada, do projeto de pesquisa intitulado "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas em amostras de pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia" com atualização do projeto contendo todas as outras neoplasias a serem avaliadas atualmente:

- 1 Leucemias agudas;
  - 1.1 Leucemias mielóides agudas;
  - 1.2 Leucemias linfóides agudas;
- 2 Doenças mieloproliferativas crônicas;
  - 2.1 Leucemia mielóide crônica;
  - 2.2 Policitemia Vera;
  - 2.3 Trombocitemia essencial;
  - 2.4 Mielofibrose;
  - 2.5 Mieloma múltiplo;
  - 2.6 Mielodisplasia;
- 3 Doenças linfoproliferativas crônicas;
  - 3.1 Leucemia linfocítica crônica;
  - 3.2 Leucemiaprolinfocítica;
  - 3.3 Tricoleucemia;
- 4. Linfomas (Hodgkin e Não-Hodgkin).

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

## ANEXO II – Ficha Clínica dos Pacientes

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Nasc.: \_\_\_\_\_ Diag.: \_\_\_\_\_ Última consulta: \_\_\_\_\_ Óbito: \_\_\_\_\_

Causa do óbito: \_\_\_\_\_

Cerv.: \_\_\_\_\_ Axilar: \_\_\_\_\_ Ing.: \_\_\_\_\_ Fígado: \_\_\_\_\_ Baço: \_\_\_\_\_

Rai: \_\_\_\_\_ Binet: \_\_\_\_\_ CD: \_\_\_\_\_ Cl: \_\_\_\_\_

Hb: \_\_\_\_\_ GB: \_\_\_\_\_ Linfo%: \_\_\_\_\_ Linfo-abs: \_\_\_\_\_ Plaquetas: \_\_\_\_\_

LDH: \_\_\_\_\_ AU: \_\_\_\_\_ Creatinina: \_\_\_\_\_  $\beta_2$ -microglobulina: \_\_\_\_\_

CD3 \_\_\_\_\_ CD4 \_\_\_\_\_ CD5 \_\_\_\_\_ CD10 \_\_\_\_\_ CD11c \_\_\_\_\_ CD19 \_\_\_\_\_ CD20 \_\_\_\_\_ CD22 \_\_\_\_\_ CD23 \_\_\_\_\_

CD25 \_\_\_\_\_ CD38 \_\_\_\_\_ Ig $\mu$  \_\_\_\_\_ Kappa \_\_\_\_\_ lambda \_\_\_\_\_ HLA-DR \_\_\_\_\_ FMCT \_\_\_\_\_ Outros: \_\_\_\_\_

Mielograma: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BMO: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Citogenética: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO III- Termo de Consentimento livre e esclarecido dos pacientes

### 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 DA EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA QUINASE AKT, DE MICRORNAS E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-4 RELACIONADOS COM A PATOGÊNESE 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 e 5 mL de sangue da medula (se houver solicitação médica) 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. Em caso de punção de medula, este procedimento será realizado pelo seu médico hematologista. 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.

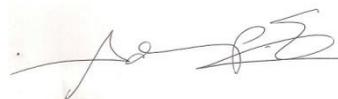
Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com o Professor Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia/UFMG, através do telefone 3409-6882. Informações sobre os aspectos éticos da pesquisa poderão ser obtidas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizado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

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Documento de identificação:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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



## ANEXO IV- Termo de Consentimento livre e esclarecido dos controles

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Controles

**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 DA EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA QUINASE AKT, DE MICRORNAS E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-4 RELACIONADOS COM A PATOGÊNESE 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. Estamos recrutando pessoas saudáveis comparadas ao nosso grupo de estudo, para avaliarmos potencial diferença diagnóstica nos parâmetros analisados entre pacientes e a população saudável. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de apenas 16 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. Este termo TCLE encontra-se em consonância com a RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012. 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.

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Documento de identificação:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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



## ANEXO V – Artigos publicados

Biomedicine &amp; Pharmacotherapy 97 (2018) 349–358



Contents lists available at ScienceDirect

## Biomedicine &amp; Pharmacotherapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioph](http://www.elsevier.com/locate/bioph)

## Review

## Advances in chronic lymphocytic leukemia pharmacotherapy



Lorena Caixeta Gomes<sup>a</sup>, Aline Lúcia Menezes Ferrão<sup>a</sup>, Fernanda Cristina Gontijo Evangelista<sup>a</sup>,  
Tâmara Dauare de Almeida<sup>a</sup>, Rayson Carvalho Barbosa<sup>b</sup>, Maria das Graças Carvalho<sup>a</sup>,  
Adriano de Paula Sabino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Address: 6627, Presidente Antônio Carlos Ave, Pampulha, Zip Code 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Address: 6627, Presidente Antônio Carlos Ave, Pampulha, Zip Code 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Chronic lymphocytic leukemia  
Therapy  
Prognosis  
Biomarkers

## ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disease that affects B lymphocytes in most cases. Leukemic lymphocytes have prolonged longevity, defined by resistance to apoptosis. These cells can accumulate in peripheral blood, bone marrow, and solid lymphoid organs. CLL may be indolent or aggressive and has a range of prognostic factors such as expression of CD38 and ZAP-70, immunophenotypic and cytogenetic changes, imbalanced apoptosis proteins, and others. Although CLL has a low mortality rate, this disease is generally not considered curable until today. CLL treatment involves alkylating agents and glucocorticoids, purine analogs, monoclonal antibody therapies, and bone marrow transplantation. In recent decades, new drugs have appeared focusing on new targets and specific molecules, such as the BCR receptor, Bruton's tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, spleen tyrosine kinase, apoptosis proteins and microRNAs. The most appropriate treatment for CLL is one that involves in its protocol a combination of drugs according to the prognostic factors presented by each patient. In this sense, treatment individualization is essential. This article examines standard treatments for CLL and explores new treatments and potential new targets, as well as schematic protocols to understand where we are, how the treatment has evolved, and the advantages and disadvantages of new targets for CLL therapy.

Hematol Oncol Stem Cell Ther (2017) 10, 57–62

Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/hemonc](http://www.elsevier.com/locate/hemonc)

## ORIGINAL RESEARCH REPORT

## Prognosis biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia



Lorena Caixeta Gomes<sup>a</sup>, Fernanda Cristina Gontijo Evangelista<sup>a</sup>,  
Lirlândia Pires de Sousa<sup>a</sup>, Sergio Schusterschitz da Silva Araujo<sup>b</sup>,  
Maria das Graças Carvalho<sup>a</sup>, Adriano de Paula Sabino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Clinical and Toxicological Analysis Department, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Hematology Unit of Clinical Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Received 22 July 2016; accepted 25 December 2016

Available online 1 February 2017

## KEYWORDS

Apoptosis/survival proteins;  
Chronic lymphocytic  
leukemia;  
ZAP-70

## Abstract

**Objective/Background:** From clinical and biological points of view, chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a heterogeneous disease characterized by a progressive accumulation of lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow, and lymphoid organs. New prognostic markers in CLL may be useful to clinicians for predicting outcome and in clinical decision-making. The aim of this study was to evaluate the potential prognostic value of the apoptotic/survival-controlling proteins and protein tyrosine kinase ZAP-70 gene expression in CLL patients and control individuals, correlating such findings with patients' clinical data.

**Methods:** Fifty-three patients diagnosed with CLL attending the hematology service of a clinical hospital, and 24 healthy individuals with no history of leukemia (Control group) were enrolled in this study. Analyses of apoptotic/survival-controlling proteins were performed by western blot and ZAP-70 gene expression was evaluated by real-time polymerase chain reaction.

**Results:** Significant differences were observed for the p-p38, Mcl-1 long, and Mcl-1 short proteins when patients were compared with CLL and controls. A positive correlation between the results for Mcl-1 short and Mcl-1 long and lymphocyte count was observed, corroborating the hypothesis of an imbalance between proteins of cell survival pathways/apoptosis in CLL.

## APÊNDICE I – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com LLC

AKT+miR	Idade	Sexo	Binet	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	LDH (U/L)	Ácido úrico (mg/dL)	PCR (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Gama GT (U/L)	FA (U/L)	Bil. Total (mg/dL)	Bil. Direta (mg/dL)	Bil. Indireta (mg/dL)	VHS (mm/h)	Ret. (%)	B2M (µg/mL)
2	75,4	F	A	35	0,91	1130	3,8		40	22	89,6	134	0,23	0,19	0,04		0,009	4,28
9	82,5	F	B+C	77	1,32	864	4,9	75,68	24	16						30	1,1	
76	30	F	A	16	0,65	508	2,2		75	68	176	249	0,6	0,49	0,11			
71	71	F	A	30	0,76	469	6,1		22	26	21	71	0,8	0,46	0,34			
1	66,2	F	B+C	34	0,71	472		20,59	28	33	97	203	0,59	0,59	0			
80	58	F	A	20	1,2	359	8,02	7,88	32	45	46	92	0,64	0,44	0,2			
74	54	F	A	41	0,67	220	4,6	2,6	28	37	14	45	0,7	0,1	0,6	8	1	
82	67	F	B+C	44	0,67	781	4,9		27	32	141	76	0,67	0,22	0,45			
8	64,7	F	A															
47	88	M	A		0,49	358		8,15					0,69	0,51	0,18	6		2,8
4	62,6	M	A	30	0,63	563	4,3	<5,00	29	41	64,2	96		1,87		2	1,6	1,87
34	86	M	B+C	74	1,87	553	8,2	27,52	12	19	31,7	115	0,76	0,48	0,28		0,013	10,84
45	72,2	M	B+C	33	0,82	409	6,2	9,56	26	36	23,9	53	0,61	0,3	0,31	2	0,013	
41	73,7	F	A	31	0,61	654	2,3		22	26	33,7	67	0,21	0,1	0,11		0,02	
48	78	M	B+C	29	0,97	394	5,9											
42	27	M	A		0,73	588												4,43
78	77	M	B+C	51	0,9	681	6,4		23	19	26	72	0,52	0,3	0,22			
25	80,2	M	B+C	73	2,2	732	8,5										1,6	
11	53	M	B+C	45	0,88	766	6,4		31	43	36,3	65	1,21	0,44	0,77			
38	83	M	B+C	44	1,34	482	5,2		22	23	28	72	0,82	0,31	0,51			
36	67,4	F	A	32	0,75	504	6,8		32	33	44,6	74	0,68	0,32	0,36			
27	75	M	B+C	21	1	554	6,2		46	39	36	56						3,74
73	56	F	A			289			22	26	15,9	91						
81		M	B+C															
28	59,1	M	A	116	5,17			576,48	64	24	442,4	204	2,79	2,64	0,15			
14	80,1	F	B+C	40	0,8	476	6,8		23	32	28	56	0,83	0,45	0,38		1,2	4,32
84	74	F	B+C	27	0,64	618	2,1		25	32	31	88	0,74	0,45	0,29			
72	50	F	A	37	0,75	688			37	28	19	84	0,5	0,37	0,13			
75	54	M	A	44	0,89		5,1		37	48	140	114	0,43	0,43	0			
22	87,5	F	A	47	1,07	486	5,4		21	17	26,5	76	0,56	0,38	0,18		0,012	1,26
13	77,2	M	B+C	21	1,12				46	39	36	56						
20	72,1	M	A	31	1,3	591	3,7	6,11	30	45	58,5	84	0,44	0,22	0,22			
24	59,6	M	A	38	1,23	518	7,6		18	20	24	99						0,95
79	23	M	B+C	49	1,01	780	8,1		24	32	16		0,48	0,3	0,18			
18	62	M	A	27	1	557	1,4	25	23	37	18	83	1	0,2	0,8			
43	50,5	M	A	39	0,95	160	5,5		19	16	32	61	0,6	0,4	0,2	2	1,9	1,8
83	50	M	A	44	0,83				13	28	14	51	0,49	0,25	0,24			
16	54	F	B+C	37	0,69	513	3,2		23	28	38	92	0,59	0,51	0,08			
12	67	F	A	26	0,59	644	4,8		44	54	35	74	0,6	0,26	0,34		1,1	
19	73,9	F	A	41	0,79	593	5,9		26	38	31,8	96	0,54	0,05	0,49			
10	55	F	A	34		527	4,4		33	42	83	140						
5	56	F	A		0,55	441	6,6											2,74
37	64,9	M	A	38	1,5		5,1	109	35	55	38	70	1,06					
29	69,3	M	A	65	0,95	404	6,7	6,75	22	22	20,8	76				2		1,39
30	54	M	A	43	1,21	394	6	208,05	15	13	30	85	0,32	0,28	0,04			
39	81,1	F	A	50	1,14	490	4,5										0,009	1,27
31	58,2	M	A	50	1,14	558		7,68								2	1,3	
49	47	M	B+C	23	0,94			5,61	10	27	23	42	0,46	0,36	0,1			
15	75,4	M	B+C	41	1,28	562	7,3	8,21	17	18	29,9	91	0,77	0,54	0,23		0,02	4,7
3	86,5	F	A	32	0,7	372		51,05								76	0,012	
7	78,7	F	A	57	1,12	597	4,4		22	18	15,2	96	0,7	0,12	0,58			
17	77	F	A	34	1,5	450	4,6		18	26			1,1			80	0,8	3,86
26	77,4	M	A	43	1,01	519	4,7	1,01	29	25	28,9	64	0,68	0,17	0,51		1,3	
33	57	M	B+C	20	0,69	752	8,6	22,35	34	23	19,5	116	0,58	0,33	0,25			
35	62,9	M	A	43	1,04	541	7,3	11,46	42	43						10		1,87
44	56,5	M	A	46	0,98	474	5,3	7,98	22	21	23,1	70				4		1,7

RBC (10 <sup>3</sup> /μL)	HGB (g/dL)	PLT (10 <sup>3</sup> /μL)	WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	LYM (10 <sup>3</sup> /μL)	LYM (%)	NEUT (10 <sup>3</sup> /μL)	NEUT (%)	MONOC (10 <sup>3</sup> /μL)	MONOC (%)	EOS (10 <sup>3</sup> /μL)	EOS (%)	BAS (10 <sup>3</sup> /μL)	BAS (%)	Medicamento
4,01	11,9	177	6,8	6,664	98	0,136	2	0	0	0	0	0	0	NC
3,56	10,9	106	10,5	5,88	56	4,305	41	0,105	1	0,105	1	0,105	1	NC
3,2	8,3	195	10,72	8,6	80	1,608	15	0,5	5	0	0	0	0	NC
4,64	13,5	119	10,47	9	86	1,05	10	0,31	3	0	0	0	0	NC
3,03	10,9	66	5,2	4,264	82	0,78	15	0,104	2	0,052	1	0	0	NC
5,25	15,9	61	9	5,49	61	2,8	31,3	0,45	5	0,18	2	0,06	0,7	NC
4,6	11,4	155	59,2	56,832	96	2,24	3,8	0,11	0,2	0	0	0	0	Ibrutinib
3,76	11,1	137	15,52	11,62	75	1,24	8	2,31	14,9	0,2	1,3	0,12	0,8	NC
4,82	13	205	19,4	10,282	53	8,148	42	0,97	5	0	0	0	0	NC
3,8	10,9	230	21,9	18,615	85	2,409	11	0,657	3	0,219	1	0	0	NC
5,8	18,9	118	45,9	36,72	80	7,344	16	1,377	3	0,459	1	0	0	NC
2,94	9	92	50,9	44,792	88	5,09	10	1,018	2	0	0	0	0	NC
4,04	13	140	48,3	37,191	77	8,694	18	1,449	3	0,966	2	0	0	NC
3,31	10,6	144	9,9	7,821	79	1,683	17	0,198	2	0,198	2	0	0	NC
4,93	14,5	182	1,192	0,763	64	3,93	33	0,12	1	0	0	0	0	NC
3,21	7,9	582	5	3,4	67									NC
3,87	13,4	172	64,23	62,3	97	1,22	2	0,61	1	0	0	0	0	NC
4,11	10,1	179	38,8	33,368	86	4,268	11	1,164	3	0	0	0	0	NC
3,91	10,6	110	17,2	16,512	96	0,516	3	0,172	1	0	0	0	0	NC
3,7	9,8	112	40,3	39,897	99	0,403	1	0	0	0	0	0	0	NC
5	14,5	233	7,4	1,628	22	5,328	72	0,222	3	0,148	2	0,074	1	NC
4,11	13,4	57	3,1	1,9	61,7	0,21	7	0,062	2	0,031	1	0	0	NC
3,66	11,7	107	3,4	1,428	42	1,5	47	0,2	6	0,1	3	0,06	2	NC
														NC
4,47	13	139	8,7	2,349	27	5,916	68	0,174	2	0,174	2	0,087	1	NC
4,94	12,4	34	4,1	1,927	47	2,091	51	0,082	2	0	0	0	0	NC
1,2	6,5	28	91,22	89,9	98	0,71	0,78	0	0	0	0	1,11	1,22	NC
3,12	8,6	123	95,9	63,294	66	27,81	29	4,79	5	0	0	0	0	NC
2,97	9,6	177	72,43	65,19	90	5,79	8	0,72	1	0	0	0	0	NC
4,99	14,2	201	38,2	31,706	83	4,966	13	1,146	3	0,382	1	0	0	NC
4,24	12,5	63	6,2	4,65	75	1,24	20	0,186	3	0,124	2	0	0	NC
4,06	12,3	129	3,8	1,71	45	1,9	50	0,152	4	0,00	0	0,04	1	NC
5,06	14	151	18,6	13,764	74	3,72	20	0,744	4	0,372	2	0	0	NC
3,92	10,2	150	72,92	67,82	93	3,65	5	0	0	0	0	0	0	Losartana
5,46	15,6	180	4,3	2,3	54,4	0,75	17,6	0,94	22	0,25	6	0	0	Carbamazepina, Cloramfucil+Prednisona 18-2H/06
4,05	15,5	211	28	20,16	72	6,72	24	1,12	4	0,00	0	0,00	0	Captopril, Atenolol, Diovan HCT
2,2	6,4	195	42,09	34,72	82,5	5,72	13,6	0,88	2,1	0,59	1,4	0,17	0,4	Captopril, Atenolol, Diovan HCT
4,27	14	92	23,8	11,66	49	8,8	37	2,38	10	0,74	3	0,23	1	NC
1,1	12,7	108	29,96	27,26	94,5	1,19	4	0,44	1,5	0	0	0	0	Cloramfucil
3,47	11,1	125	49	44,1	90	2,94	6	1,47	3	0,49	1	0	0	NC
5,02	12,5	197	5,5	3,575	65	1,595	29	0,165	3	0,11	2	0,055	1	NC
3,83	12,8	205	5,23	2,98	57	1,15	22	0,89	17	0	0	0,05	1	Cloramfucil
4,47	14,5	148	70,1	65,894	94	4,206	6	0	0	0	0	0	0	Sinvastatina e insulina
4,77	14,8	157	30,2	25,368	84	4,228	14	0,604	2	0	0	0	0	Cloramfucil
4,13	12,8	187	149,93	146,94	98	2,99	2	0	0	0	0	0	0	CHOP+Rituximab (6 CICLOS)
4,08	12,1	193	49,2	37,392	76	10,332	21	0,984	2	0,492	1	0	0	Cloranfenicol
6,01	15,6	203	74,7	56,025	75	16,434	22	1,494	2	0,747	1	0	0	NC
3,42	12,1	106	9,3	8,556	92	0,744	8	0	0	0	0	0	0	Enalapril, Hidroclorotiazida
1,81	5,3	13	2,6	1,378	53	1,118	43	0,052	2	0,026	1	0,026	1	NC
4,76	12,2	185	17,9	13,783	77	3,043	17	0,716	4	0,358	2	0	0	Cloramfucil e G-CSF
4,81	13,7	163	33,5	24,12	72	8,04	24	1,005	3	0,335	1	0	0	Metformina, Glibenclamida, CaCO3 e AAS
4,15	12	283	20,6	17,2	88,6	1,64	8	0,41	2	0,28	1,4	0	0	NC
4,45	12,9	114	37,4	28,05	75	7,854	21	1,122	3	0,374	1	0	0	NC
3,2	9,1	137	61	59,17	97	1,83	3	0	0	0	0	0	0	NC
6,42	18,4	136	14,8	10,656	72	3,552	24	0,444	3	0,148	1	0	0	NC
3,2	11,6	116	11,7	10,413	89	1,053	9	0,117	1	0,117	1	0	0	NC

**Legenda: AAS, ácido acetilsalicílico; ALT, alanina transaminase; AST, aspartato transaminase; B2M, beta-2 microglobulina; BAS, basófilo; Bil, bilirrubina; CHOP, Ciclofosfamida, Hidroxidoxorubicina, Vincristina, Prednisona; EOS, eosinófilo; FA, fosfatase alcalina; Gama GT, gama glutamyl transpeptidase; G-CSF, fator estimulador da colônia granulocítica; HGB, hemoglobina; LDH, lactato desidrogenase, LYM, linfócito; miR, microRNA; MONOC, monócito; NC, não consta; NEUT, neutrófilo; PCR, proteína C reativa; PLT, plaqueta; RBC, hemácias; Ret, reticulócitos; VHS, velocidade de hemossedimentação; WBC, global de leucócitos.**

## **ANEXO VI- Apresentações em congressos**

O presente trabalho foi apresentado em forma de pôster nos seguintes congressos:

- IV Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, 2018: Chronic lymphocytic leukemia: evaluation of protein kinase AKT and microRNAs gene expression and their importance in disease pathogenesis.
- 51 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2017: Chronic lymphocytic leukemia: is there a role for circulating microparticles or thrombin generation in clinical heterogeneity?
- Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia celular, 2017: Avaliação da expressão gênica da proteína cinase AKT em mulheres com Leucemia Linfocítica Crônica.
- 50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, 2016: Avaliação da expressão gênica da proteína tirosina cinase ZAP-70 e do mecanismo apoptótico em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica.
- Congresso Brasileiro de Hematologia, hemoterapia e terapia celular, 2016: Avaliação da expressão gênica da proteína-tirosina cinase ZAP-70 e do mecanismo apoptótico em pacientes com leucemia linfocítica crônica.

O presente trabalho foi apresentado de forma oral nos seguintes congressos:

- 3rd Ibero American Meeting on Chronic Lymphocytic Leukemia, Buenos Aires, 2018: Chronic lymphocytic leukemia: evaluation of protein kinase AKT and microRNAs gene expression and their importance in disease pathogenesis.
- Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia celular, São Paulo, 2018: Chronic lymphocytic leukemia: evaluation of protein

kinase AKT and microRNAs gene expression and their importance in disease pathogenesis.

## **ANEXO VII: Experiência no exterior**

Intercâmbio na Universidad de Málaga- Málaga- Espanha

Duração: 3 meses (06 dez 2015- 06 março 2016)

O objetivo geral do trabalho feito no intercâmbio foi compreender a importância do ciclo Glutamina/Glutamato e bem como as enzimas envolvidas nesse ciclo como as isoformas Glutaminase (GLS) e Glutaminase 2 (GLS2) com a progressão de cânceres como neuroblastoma e gliomas.

A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma. Além disso, ela é essencial para várias reações no organismo, especialmente em situações de diminuição de nutrientes ou de estresse. É o melhor combustível respiratório tanto para tumores humanos e para tumores em experimento (in vitro). Em geral, pode-se dizer que os níveis de consumo de glutamina são proporcionais ao nível de proliferação celular do tumor.

Sabe-se que a GLS induz a proliferação celular, ativa cMYC (inibe miRNA-23 e aumenta o uso de glutamina), NFkB, inibe proteínas apoptóticas e aumenta a chance de metástase. Já sobre a GLS2 pouco se sabe, sua expressão é aumentada em linfócitos maduros de pacientes com aplasia medular enquanto há supressão de GLS. Os transcritos de GLS2 estão diminuídos em carcinoma hepatocelular e glioblastoma maligno, mostrando que ela talvez tenha um efeito protetor contra o câncer além de ser alvo de p53.

Objetivos específicos do trabalho realizado no intercâmbio:

- Cultivar células da linhagem SHSY-5Y (neuroblastoma) e T98G (glioblastoma).
- Silenciar GLS e estimular GLS2 (feito pelos meus colegas).
- Tratar das células com PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE (PMA).
- Extrair proteínas dos núcleos celulares.
- Quantificar as proteínas nucleares pelo método de Bradford.
- Compreender as funções da glutaminase 2 na linhagem SHSY-5Y.

- Compreender a relação entre os níveis de GLS2 e o estado de diferenciação das células SHSY-5Y (neuroblastoma) através da identificação do ciclo celular por citometria de fluxo (BD FACSVerser).
- Identificar a atividade catalítica de GLS2, através dos níveis de glutamina e glutamato determinados por HPLC- tecnologia SELDI-TOF (Agilent Technologies 1200 series).

#### Conclusões:

- Concluiu-se que o silenciamento de GLS ou o aumento de GLS2 diminuiu a sobrevivência das células de glioma.
- A geração de ROS pelo tratamento com agentes oxidativos sinérgicos, com silenciamento de GLS e também com aumento de GLS2, foi importante para a supressão da malignidade das células do glioma, incluindo a redução da mobilidade celular.
- Notou-se que, bloqueando GLS ou aumentando a expressão de GLS2 diminuíram-se os níveis de expressão de c-Myc e Bcl-2 e aumentou-se a expressão de Bid (proapoptótico).
- A combinação da modulação da expressão da glutaminase e o tratamento com agentes oxidativos pode ser uma estratégia para o tratamento de gliomas e outros cânceres intratáveis.
- Concluiu-se que claramente GLS e GLS2 possuem mecanismos distintos de ação, propriedades moleculares e imunológicas diferentes e forte dependência dos tipos de fatores, sinais, microambiente, células e tecidos acometidos.

Quais os benefícios do intercâmbio para meu doutorado?

Foi possível acompanhar um trabalho paralelo com camundongos com LLA-T (com mutação de NOTCH1) divididos em PTEN positivos e PTEN negativos.

Observou-se que as células leucêmicas, NOTCH1, utilizam glutamina como fonte de carbono. A glutamina é convertida em glutamato (ciclo de Krebs). Nas células com deleção de PTEN houve um aumento considerável de

lactato e conseqüentemente glicólise. Quando NOTCH1 foi inibido houve uma diminuição de glicose, lactato e glutamina.

Observou-se que na progressão da doença, os camundongos Pten negativos apresentaram aumento de AKT e aumento de GLS comparado aos controles. O aumento de GLS conferiu resistência ao tratamento com inibidor de NOTCH1. Por outro lado, a inibição de GLS diminuiu o crescimento celular, aumentou a sobrevida (nos modelos Pten positivos) e demonstrou-se um potente antileucêmico combinado com inibidor de NOTCH1.

Além da importância da via da glutamina para vias conhecidamente alteradas na LLC, observa-se uma relação das glutaminases com microRNAs, o que motivou o estudo destes na LLC. Talvez o trabalho feito com células de neuroblastomas, glioblastomas e LLA-T possa ser repetido em células da LLC. Isso também reforça a ideia de que vias bioquímicas básicas possa trazer informações importantes sobre cânceres, possam ser alvos de medicamentos e não devem ser deixadas de lado.

Com esse trabalho obtive experiência em novos tipos de cânceres (glioblastoma e neuroblastoma), os quais eu não havia trabalhado antes. Aprendi novas técnicas como cultivo celular, citometria de fluxo e HPLC, as quais eu não tinha experiência. Assim, meu trabalho foi muito produtivo e trouxe muito crescimento pessoal e profissional.