



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Ana Gabriela Rosa

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs EM PACIENTE COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B COM FUSÃO GÊNICA TCF3-PBX1
RESULTANTE DA TRANSLOCAÇÃO t(1;19)(q23;p13.3): RELATO DE CASO**

Florianópolis
2021

Ana Gabriela Rosa

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs EM PACIENTE COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B COM FUSÃO GÊNICA TCF3-PBX1
RESULTANTE DA TRANSLOCAÇÃO t(1;19)(q23;p13.3): RELATO DE CASO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para conclusão do Curso de Graduação em Farmácia

Orientadora: Prof. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coorientadora: Dra Júlia Cisilotto

**Florianópolis
2021**

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

Rosa, Ana Gabriela

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs EM PACIENTE COM
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B COM FUSÃO GÊNICA
TCF3-PBX1 RESULTANTE DA TRANSLOCAÇÃO t(1;19)(q23;p13.3):
RELATO DE CASO / Ana Gabriela Rosa ; orientador, Tânia
Beatriz Creczynski Pasa, coorientador, Júlia Cisilotto,
2021.

31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Leucemia linfoblástica aguda de células
B. 3. TCF3-PBX1. 4. t(1;19) (q23; p13). 5. microRNAs. I.
Creczynski Pasa, Tânia Beatriz . II. Cisilotto, Júlia. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. IV. Título.

Ana Gabriela Rosa

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs EM PACIENTE COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B COM FUSÃO GÊNICA TCF3-PBX1
RESULTANTE DA TRANSLOCAÇÃO t(1;19)(q23;p13.3): RELATO DE CASO**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso Farmácia

Florianópolis, 22 de setembro de 2021.

Prof^a Dr^a Liliete Canes Souza Cordeiro
Coordenadora do Curso
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Dra Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra Júlia Cisilotto
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^a Adny Henrique Silva
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Dr^a Lílian Sibelle Campos Bernardes
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Este Trabalho de Conclusão de Curso é apresentado na forma de artigo para ser submetido a publicação em uma revista a ser definida pelos autores posteriormente.

RESUMO

A Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) é uma doença hematológica caracterizada pela proliferação descontrolada de células precursoras linfoides B na medula óssea. A fusão gênica TCF3-PBX1 gerada como produto da translocação cromossômica t(1;19)(q23;p13.3) é uma das mais comuns em crianças com LLA-B, ocorrendo em cerca de 6% dos casos da doença. A detecção de anormalidades genéticas é um fator importante nesses casos, ajudando a elucidar prognósticos, assim como determinar o tratamento a ser seguido. Pequenas moléculas de RNA capazes de regular a expressão gênica, chamadas de microRNAs (miRNAs), desempenham um papel importante no desenvolvimento celular e, conseqüentemente, estão também envolvidos no desenvolvimento tumoral. miRNAs vem sendo amplamente estudados como biomarcadores de diversas neoplasias, incluindo biomarcadores diferenciais, capazes de identificar subtipos genéticos de uma mesma doença. Por esta razão, neste trabalho é relatado o perfil de expressão de miRNAs de um paciente com LLA-B infantil com fusão TCF3-PBX1 resultante da t(1;19)(q23;p13.3), afim de identificar miRNAs que possam estar envolvidos neste tipo de alteração. Como resultado, 29 miRNAs demonstraram estar diferencialmente expressos ($p < 0,0001$, *fold change* > 100) quando comparados aos indivíduos controle. Entre estes miRNAs, os miR-34a-5p, miR-708-5p e miR-128-3p apresentaram uma superexpressão na paciente estudada, o que corrobora com achados da literatura para pacientes com LLA-B sem especificação de translocação. Já os miR-765, miR-455-3p e miR-4697-5p foram descritos pela primeira vez relacionados a casos de LLA-B, embora, estudos adicionais são necessários para avaliar o potencial como novos marcadores diferenciais.

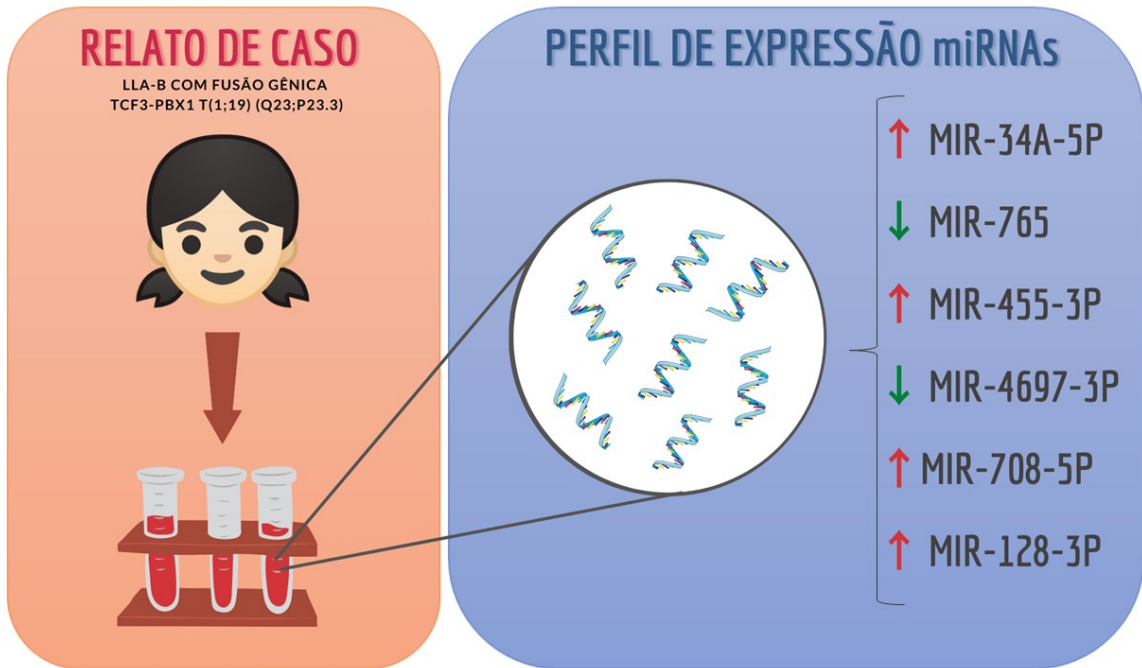
Palavras chaves: Leucemia linfoblástica aguda de células B; LLA-B; TCF3-PBX1; t(1;19) (q23; p13); microRNAs; Diagnóstico; Prognóstico.

ABSTRACT

B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL-B) is a hematologic disease characterized by the uncontrolled proliferation of B lymphoid precursor cells in the bone marrow. The TCF3-PBX1 t(1;19) (q23; p13) translocation is one of the most common in children with ALL-B, occurring in approximately 6% of the cases. The detection of genetic abnormalities is an important factor in these events, helping to elucidate prognosis, as well as to determine the treatment to be followed. Small RNA molecules capable of regulating gene expression, called microRNAs (miRNAs), play an important role in cell development and consequently are also involved in tumor development. The expression of miRNAs has been widely studied as biomarkers of several neoplasms, including the differential ones which are capable of identifying genetic subtypes of the same disease. For this reason, this work reports a miRNA expression profile of a patient with childhood ALL-B with TCF3-PBX1 t(1;19)(q23;p13.3) rearrangement in order to identify miRNAs that might be involved in this type of translocation. As a result, 29 miRNAs were shown to be differentially expressed ($p < 0.0001$, fold change > 100) when compared to control. Among these miRNAs, miR-34a-5p, miR-708-5p and miR-128-3p were overexpressed in the patient studied, which corroborates findings in the literature for patients with ALL-B without translocation specification. Conversely, miR-765, miR-455-3p and miR-4697-5p were described for the first time in relation to ALL-B cases and additional studies are needed to assess the potential as new differential biomarkers.

Palavras chaves: B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia ; ALL-B; TCF3-PBX1; t(1;19) (q23; p13); microRNAs; Diagnostic; Prognostic.

RESUMO GRÁFICO



**Expressão Diferencial de microRNAs em Paciente com Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B com Fusão Gênica TCF3-PBX1 Resultante da Translocação t(1;19)(q23;p13.3):
Relato De Caso**

Ana Gabriela Rosa¹; Tânia Souza de Liz¹, Júlia Cisilotto¹; Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, SC, Brasil

*Autor Correspondente:

Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Tel/Fax: (+55) (48) 32212200

e-mail: tania.pasa@ufsc.br

INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) é uma das doenças malignas mais comuns observadas na faixa etária pediátrica. Caracteriza-se por células precursoras de linfócitos B reproduzindo-se de forma incontrolável na medula óssea, com liberação no sangue periférico e locais extramedulares (SWERDLOW et al., 2017). As LLA-B podem ser classificadas pelo imunofenótipo ou pela citogenética. Imunofenotipicamente as LLA-B são subdivididas em 4 estágios: pró-B; comum; pré-B e células B maduras, do fenótipo mais imaturo para o mais maduro (SILVA, 2009). A imunofenotipagem é realizada por meio de citometria de fluxo que é capaz de identificar moléculas marcadoras da superfície celular, conhecidas como CD (grupo de diferenciação, do inglês: Cluster of differentiation). Cada estágio de diferenciação possui um grupo específico de expressão de CD, possibilitando o respectivo diagnóstico. Em todas as LLA-B as células geralmente são positivas para a Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), CD79, HLA-DR, CD19 e CD22 (SILVA, 2009). Na LLA do tipo pró-B as células expressam HLA-DR, TdT, CD34, CD19 e CD22(c), a LLA do tipo comum expressa CD10, CD22(c), CD19 e/ou CD20 (FARIAS; CASTRO, 2004). A leucemia pré-B expressa cadeia μ , citoplasmática, CD19, CD20 e CD10 e a LLA do tipo B maduro apresenta um fenótipo incomum, apresentando a expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (SmIg) (FARIAS; CASTRO, 2004). A outra forma de classificação das LLAs-B é pela análise citogenética, que se divide em numéricas, quando há um aumento ou diminuição na quantidade de cromossomos, ou estruturais, quando há alteração da estrutura original cromossômica, como em translocações. As anormalidades cromossômicas limitam-se às células blásticas, desaparecem durante a fase de remissão da doença e reaparecem na fase de recidiva, fornecendo parâmetros importantes para o prognóstico (HRUŠÁK; PORWIT-MACDONALD, 2002).

A translocação t(1;19)(q23;p13.3), uma das alterações citogenéticas mais comuns presente na LLA-B, ocorre pela junção do gene TCF3 (também conhecido como E2A) localizado cromossomo 19 com o gene PBX1 localizado no cromossomo 1, resultando na proteína de fusão TCF3-PBX1, que atua reprimindo a diferenciação celular (SWERDLOW et al., 2017). Evidências sugerem que esta fusão deriva de uma origem pós-natal, diferente de outras translocações, que ocorrem predominantemente no período pré-natal (WIEMELS et al., 2002). Historicamente, essa alteração é associada com pior prognóstico e maior chance de recidiva, devido a correlação com características clínicas de alto risco, como leucocitose, níveis

elevados de lactato desidrogenase (LDH) e envolvimento do sistema nervoso central (SWERDLOW et al., 2017). Porém, com os protocolos de tratamento atuais, pacientes com este genótipo têm obtido melhores resultados. No entanto, aproximadamente 20% dos pacientes ainda apresentam recidiva da doença, evidenciando a importância na busca pela identificação de novos marcadores prognósticos (VROOMAN; SILVERMAN, 2016).

Os microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNAs endógenos com aproximadamente 22 nucleotídeos, vem sendo estudados como importantes marcadores de diagnóstico e prognóstico de diversas doenças, bem como leucemias (PENG; CROCE, 2016). Os miRNAs desempenham papéis regulatórios importantes, capazes de regular a expressão gênica pela clivagem ou repressão da tradução de um RNA mensageiro (mRNA) alvo. Os miRNAs são associados a carcinogênese, pois atuam em inúmeros processos biológicos incluindo apoptose, hematopoiese, desenvolvimento e crescimento celular (LEE; DUTTA, 2009). O perfil de expressão de miRNAs tem sido útil para a classificação de vários tipos de doenças oncológicas e diversos estudos já foram conduzidos sobre o papel dos miRNAs na LLA-B, porém, poucos estudos associam conjuntos de miRNAs aos subtipos genéticos desta doença (ALMEIDA et al., 2018; SCHOTTE et al., 2008; DE LIZ et al., 2020). Desta forma, esse trabalho dispõe-se em relatar e avaliar o perfil de expressão dos miRNAs de um paciente com diagnóstico de LLA-B com fusão TCF3-PBX1 resultante da translocação (1;19)(q23;p13.3).

RELATO DE CASO

O caso a ser reportado é de um paciente do sexo feminino diagnosticado com LLA-B aos 12 anos de idade. As suspeitas começaram a partir de um hemograma, realizado em fevereiro de 2018, que apresentou aumento na quantidade de leucócitos e presença de linfócitos jovens sugestivos de linfoblastos. Os valores encontrados foram de 40.130 leucócitos/mm³ (2% bastonetes, 10% segmentados, 83% linfócitos, 4% monócitos, 1% eosinófilos), 4,65 milhões hemácias/ μ L, hemoglobina (Hb) de 11,9 g/dL, hematócrito (Ht) de 37% e 79.000 plaquetas/mm³. Resultados de outros parâmetros que não estavam dentro dos valores de referência foram o de LDH com 3343,4 U/L (Valor de Referência: < 480,0 U/L) e proteína C reativa (PCR) com 41,78 mg/L (Valor de Referência: < 1,00 mg/L). Os demais parâmetros bioquímicos analisados apresentaram resultados dentro da normalidade. O diagnóstico confirmatório foi então realizado por mielograma, que apresentou 86% de blastos infiltrados na

medula óssea e imunofenotipagem com 92% de células blásticas positivas para CD45+/-, CD19+, CD79a+, CD58+, CD10++, CD38+, CD20+(5%), TDT+, CD22+, D24+, CD9+ e CD81++. Por fim, foi realizado o exame de RT-PCR que detectou a fusão do gene TCF3-PBX1-t(1:19). Para melhor visualização, os resultados dos exames estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos exames de hemograma, mielograma, imunofenotipagem, citogenética e RT-PCR da paciente diagnosticada com LLA-B translocação t(1;19) (q23; p13)/ TCF3-PBX1..

| Parâmetros | Dados clínicos | |
|--|--|-------------------|
| Hemograma | Valores de Referência | |
| Hemácias (milhões/uL) | 4,65 | 4,00 - 5,20 |
| Hemoglobina (g/dL) | 11,9 | 11,50 – 15,50 |
| Hematócrito (%) | 37 | 35,0 – 45,0 |
| Leucócitos (/mm ³) | 40.130 | 5.000 – 13.000 |
| Linfócitos típicos (/mm ³) | 33.308 | 1.200 – 6.000 |
| Plaquetas (/mm ³) | 79.000 | 150.000 – 450.000 |
| Alterações citomorfológicas | Anisocitose e presença de linfócitos jovens, sugestivos de linfoblastos | |
| Mielograma | | |
| Série granulocítica (%) | | |
| Metamielócitos | 1,2 | |
| Neutrófilos bastonetes | 1,6 | |
| Neutrófilos segmentados | 3,6 | |
| Eosinófilos | 1,2 | |
| Mitoses | Ausente | |
| Série linfomonoplasmocitária (%) | | |
| Linfócitos | 6,0 | |
| Monócitos | 0,4 | |
| Série eritrocitária (%) | | |
| Eritroblastos | 6,0 | |
| Porcentagem de blastos infiltrados na medula óssea | 86 | |
| Imunofenotipagem | | |
| Série granulocítica (%) | 2,2 | |
| Série eritróide (%) | 0,6 | |
| Monócitos (%) | 0,46 | |
| Linfócitos B (%) | 1,5 | |
| Linfócitos T (%) | 3,0 | |
| Células precursoras CD34+ (%) | 0,13 | |
| Células blásticas (%) | 92 | |
| Fenótipo dos blastos linfoides B | | |
| Antígenos positivos | CD45 ^{-/+} , CD19 ⁺ , CD79a ⁺ , CD58 ⁺ , CD10 ⁺⁺ , CD38 ⁺ , CD20 ^{+(5%)} , TDT ⁺ , CD22 ⁺ , CD24 ⁺ , CD9 ⁺ , CD81 ⁺⁺ | |
| Antígenos negativos | Mieloide: MPO, CD66c, CD117, CD13, CD123, CD15, CD65 | |

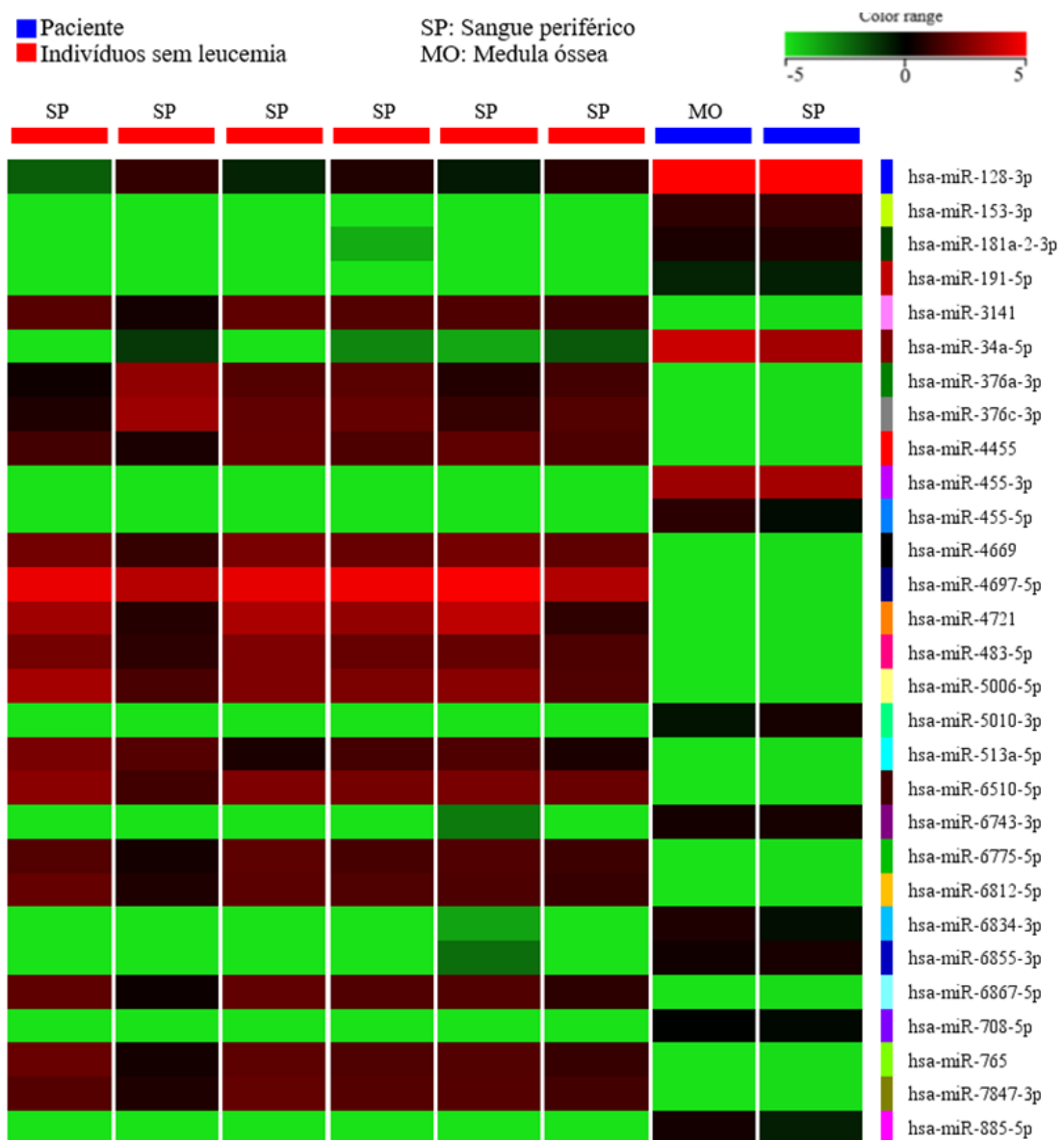
| | |
|--|--|
| Diagnóstico | Linfoide B: sIgM membrana e citoplasma, sIgKappa, sIgLambda Linfoide T/NK: CD7, CD3 citoplasma e membrana Outros: CD34, NG-2 Leucemia linfoblástica aguda B tipo comum |
| Citogenética | |
| Cariótipo | t(1;19)[06]/46,XX[06] |
| RT-PCR | |
| t(1;19) (TCF3-PBX1) | Detectado |
| CD. Cluster de diferenciação. Ig. Imunoglobulina | |

Para este paciente, a terapia foi iniciada seguindo o guia ALL IC-BFM 2009, do Grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Münster, com a administração diária de prednisona até o 33º dia de tratamento juntamente com o uso dos quimioterápicos vincristina, daunorrubicina, L-asparaginase e metotrexato intratecal em dias pré-estabelecidos conforme o protocolo I A (CAMPBELL et al., 2009). No 8º dia após o início da medicação (D8) um hemograma foi realizado para estratificação de risco da doença. Com o valor encontrado de 5.529 blastos/mm³ a paciente foi classificada como de alto risco. Durante o tratamento a paciente apresentou insuficiência cardíaca levando a suspeita de reação ao uso de daunorrubicina. Com isso, foi realizada a substituição da daunorrubicina por doxorubicina lipossomal, porém, a paciente apresentou reação anafilática. Além disso, a paciente também apresentou alergia a outros medicamentos como: L-asparaginase, pegasparginase, difenidramina e citarabina e a hemoderivados, principalmente plaquetas. Apesar das intercorrências, a paciente conseguiu finalizar o tratamento em maio de 2020 e atualmente encontra-se com negatificação de doença residual mínima.

Para realizar a análise do perfil de expressão de miRNAs da paciente foram utilizadas amostras de sangue periférico e de medula óssea coletadas no dia do diagnóstico. As análises do grupo controle foram realizadas apenas com sangue periférico coletado de crianças sem suspeita ou indicação de doença hematológica. Todos os dados coletados desta paciente foram mantidos em sigilo e anonimato. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina e pelo comitê de ética do Hospital Infantil Joana de Gusmão. Para o perfil de expressão de miRNAs foi utilizada a técnica de microarranjo de miRNA, considerando valores de *Fold Change* (FC) > 100 e valores de P < 0,0001. Foram identificados 13 miRNAs *upregulated* e 16 miRNAs *downregulated* nas amostras da paciente com LLA-B TCF3-PBX1 em relação ao grupo controle. A Figura 1 mostra o mapa de calor representando o grau de intensidade de expressão dos miRNAs

diferencialmente expressos. Observa-se que a amostra de sangue periférico e medula óssea da paciente apresentou intensidade de expressão similar e ao comparar-se estas amostras com os indivíduos sem a doença a expressão dos miRNAs apresentou intensidade diferente. Na Tabela 2 é possível verificar os 29 miRNAs diferencialmente expressos, os respectivos valores de P, FC e o status de expressão. Como pode ser observado, o miR-455-3p apresentou expressão aumentada, com o valor de FC de 1586 e o miR-4697-5p estava 836 vezes menos expresso nas amostras da paciente em relação as amostras dos indivíduos controle.

Figura 1. Mapa de calor dos miRNAs significativamente alterados nas amostras da paciente com LLA-B TCF3-PBX1 em relação às amostras dos indivíduos controle.



Os valores de intensidade expressão variaram de 5 (verde claro) a -5 (vermelho claro).

Tabela 2. miRNAs com expressão diferencial nas amostras da paciente com LLA-B TCF3-PBX1 em relação às amostras dos indivíduos controle avaliados por meio da técnica de microarranjo.

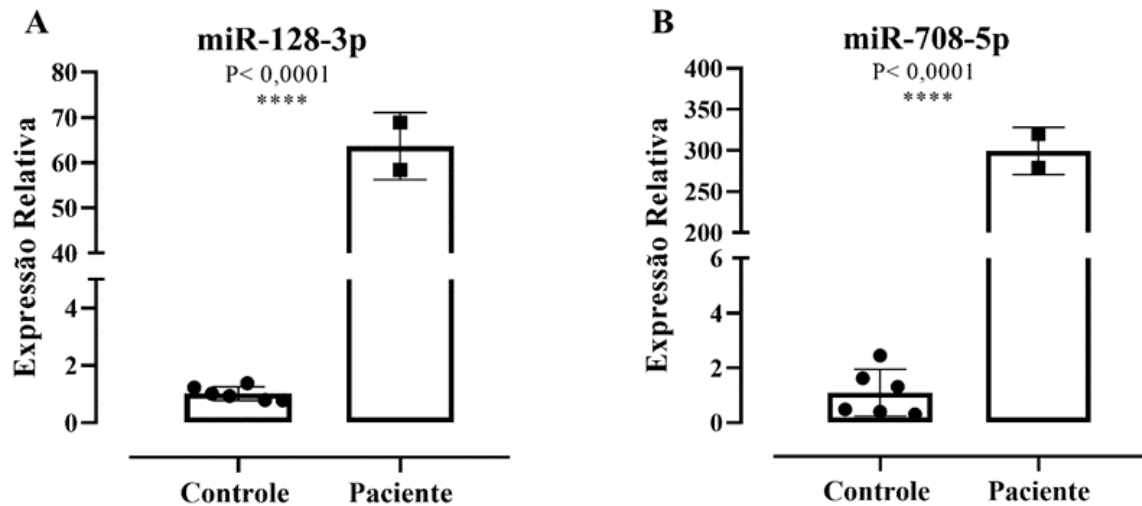
| miRNAs | Valor de p | FC | Regulação |
|---------------|----------------------|------|-----------|
| miR-455-3p | 2,05E ⁻⁰⁸ | 1586 | <i>Up</i> |
| miR-153-3p | 6,24E ⁻⁰⁷ | 360 | |
| miR-34a-5p | 4,50E ⁻⁰⁵ | 231 | |
| miR-455-5p | 1,47E ⁻⁰⁶ | 218 | |
| miR-5010-3p | 1,96E ⁻⁰⁶ | 179 | |
| miR-181a-2-3p | 6,73E ⁻⁰⁶ | 168 | |
| miR-708-5p | 1,96E ⁻⁰⁶ | 165 | |
| miR-885-5p | 1,96E ⁻⁰⁶ | 162 | |
| miR-128-3p | 2,73E ⁻⁰⁶ | 136 | |
| miR-6743-3p | 2,53E ⁻⁰⁵ | 117 | |
| miR-6855-3p | 3,49E ⁻⁰⁵ | 112 | |
| miR-191-5p | 4,11E ⁻⁰⁶ | 108 | |
| miR-6834-3p | 1,45E ⁻⁰⁵ | 108 | |
| miR-4697-5p | 2,21E ⁻⁰⁸ | 837 | |
| miR-4721 | 1,78E ⁻⁰⁶ | 233 | |
| miR-5006-5p | 9,79E ⁻⁰⁷ | 209 | |
| miR-6510-5p | 9,79E ⁻⁰⁷ | 195 | |
| miR-4669 | 1,28E ⁻⁰⁶ | 167 | |
| miR-483-5p | 1,47E ⁻⁰⁶ | 154 | |
| miR-376c-3p | 1,96E ⁻⁰⁶ | 138 | |
| miR-7847-3p | 1,96E ⁻⁰⁶ | 118 | |
| miR-4455 | 1,96E ⁻⁰⁶ | 115 | |
| miR-6812-5p | 1,96E ⁻⁰⁶ | 114 | |
| miR-765 | 2,02E ⁻⁰⁶ | 114 | |
| miR-376a-3p | 2,73E ⁻⁰⁶ | 113 | |
| miR-3141 | 2,02E ⁻⁰⁶ | 111 | |
| miR-6867-5p | 2,34E ⁻⁰⁶ | 108 | |
| miR-513a-5p | 2,55E ⁻⁰⁶ | 107 | |
| miR-6775-5p | 2,05E ⁻⁰⁶ | 107 | |

FC. *Fold change*. *Down*. Diminuição da expressão. *Up*. Aumento da expressão. Teste T moderado com correção de Benjamini-Hochberg. Expressão diferencial com FC > 100 e P < 0,0001.

Além disso, dos 29 miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo, dois já foram validados por meio da técnica de RT-qPCR: miR-128-3p e miR-708-5p. Os resultados estão apresentados na Figura 2. Ao comparar os resultados das duas técnicas utilizadas,

microarranjo e RT-qPCR, os 2 miRNAs avaliados apresentaram equivalência no status de expressão.

Figura 2. Validação da expressão dos miRNAs miR-128-3p (A) e miR-708-5p (B) nas amostras da paciente com LLA-B TCF3-PBX1 em relação às amostras dos indivíduos controle.



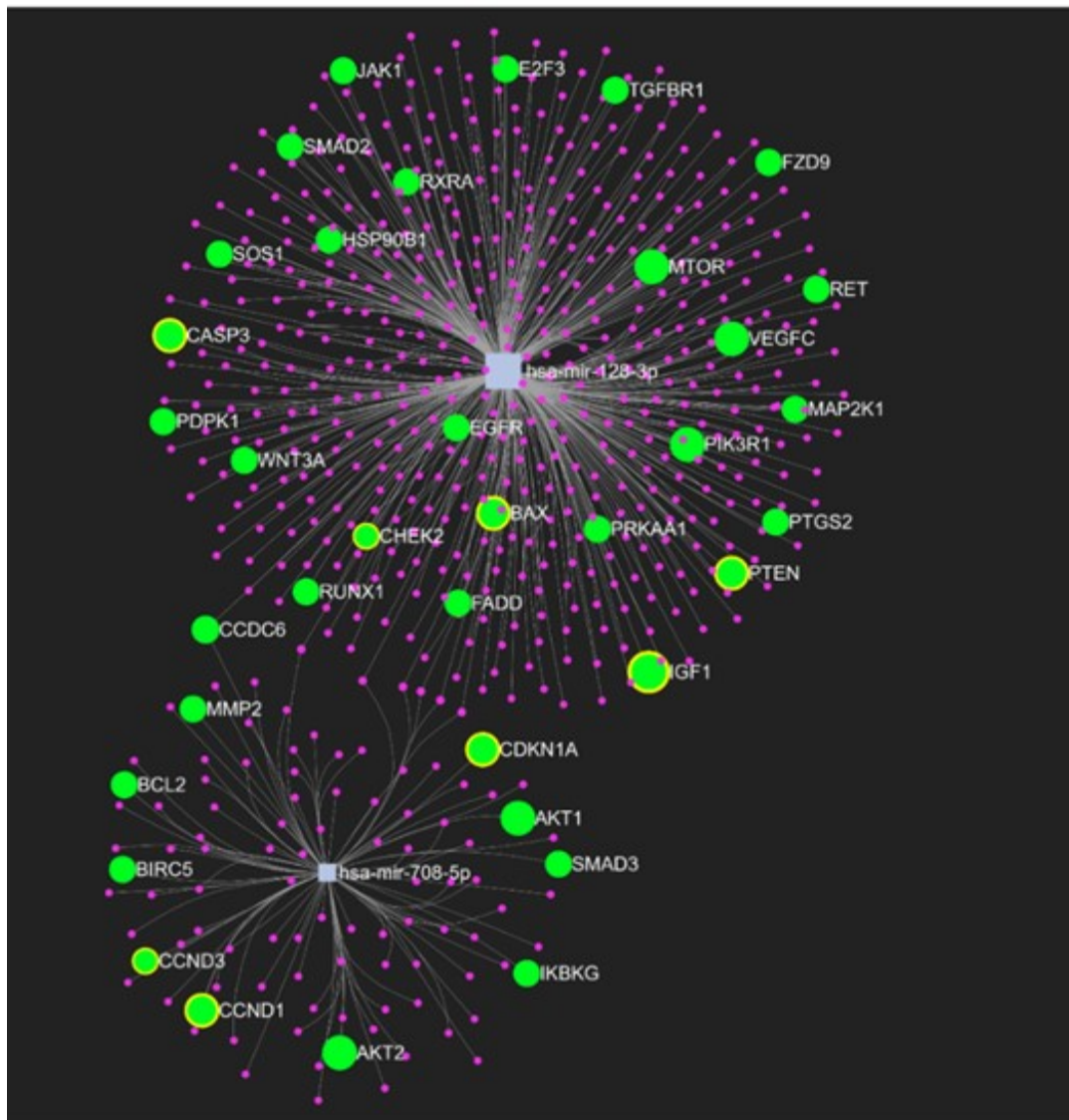
As colunas representam a média \pm o desvio padrão de expressão relativa obtidos por RT-qPCR. Asteriscos representam a diferença estatística entre os valores de expressão relativa (Teste T não pareado: ****P < 0,001).

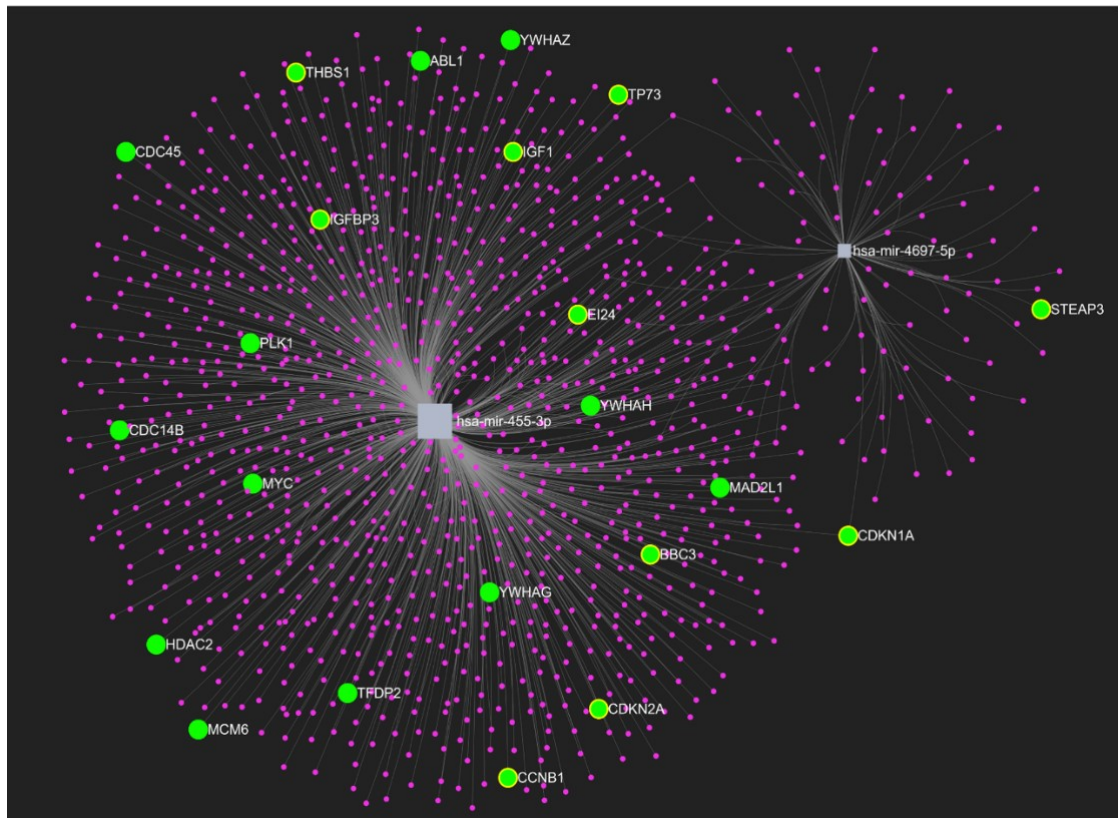
A análise de enriquecimento de vias foi realizada utilizando os miRNAs com maiores valores de FC, miR-455-3p e miR-4697-5p e com os miRNAs que já foram validados miR-128-3p e miR-708-5p (Material Suplementar Tabela S1 e S2). Para o miR-455-3p e miR-4697-5p, um total de 11 vias KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) foram enriquecidas (P < 0,05) para 79 genes alvos. Estes miRNAs regulam genes envolvidos com vias relacionadas a sinalização da p53 (CCNB1; CDKN1A; CDKN2A; IGF1; THBS1; EI24; BBC3; STEAP3; TP73; IGFBP3) e ao ciclo celular (ABL1; CCNB1; CDKN1A; CDKN2A; HDAC2; MYC; TFDP2; YWHAZ; CDC45; CDC14B; MCM6; YWHAH; MAD2L1; PLK1; YWHAG). Por outro lado, o miR-128-3p e miR-708-5p estão envolvidos com 48 vias KEGG enriquecidas (P < 0,05) com 91 genes alvos. Entre as vias que estão envolvidas com câncer, 32 genes (tais como: BAX; CASP3; MTOR; IGF1; JAK1; PIK3R1; MAP2K1; AKT1; AKT2; BCL2; CDKN1A; MMP2; CCDC6) estão envolvidos com vias relacionadas ao câncer; oito genes (MTOR; IGF1; PDPK1; PIK3R1; PRKAA1; VEGFC; AKT1; AKT2) participam da via de sinalização mTOR e oito (BAX; CASP3; IGF1; PTEN; CHEK2; CCND1; CCND3; CDKN1A)

estão relacionados com a via de sinalização da p53. A rede regulatória (Figura 3 A e B) mostra que os genes alvo, representados com círculos, podem ser regulados por um ou mais miRNAs. Os genes relacionados com as vias de regulação do câncer, de sinalização mTOR, de sinalização da p53 e do ciclo celular foram destacados em verde. Nas redes regulatórias é possível verificar que o miR-455-3p e miR-128-3p possuem maior quantidade de genes alvo validados. Observe-se que o gene inibidor de cinase dependente de ciclina CDKN1A é alvo dos miRNAs miR-455-3p, miR-4697-5p e miR-708-5p e que o gene CCDC6 (do inglês: *Coiled-Coil Domain Containing 6*) pode ser regulado tanto pelo miR-708-5p como miR-128-3p.

Figura 3. Rede regulatória para o miR-128-3p e miR-708-5p (A) e miR-455-3p e miR-4697-5p (B).

A



B

Os círculos representam os genes alvo, os quadrados cinza representam os miRNAs selecionados e as linhas mostram as relações regulatórias potenciais entre miRNAs e genes. Os círculos verdes são genes alvo relacionados a vias *Pathways in cancer*, *mTOR signaling pathway*, *p53 signaling pathway* e *Cell Cycle*.

DISCUSSÃO

Este estudo relata um caso de LLA-B com fusão TCF3-PBX1 e seu respectivo perfil de expressão de miRNAs. A diminuição da expressão do miR-24 já foi correlacionada à fusão gênica TCF3-PBX1, porém os mecanismos de ação envolvidos ainda não foram completamente elucidados (GUTIERREZ-CAMINO et al., 2020). Além disso, Schotte e colaboradores (2011) listaram os perfis de expressão de miRNAs específicos encontrados em diferentes subtipos de LLA pediátrica, e os principais achados relacionados à fusão gênica TCF3-PBX1 foram a diminuição da expressão dos seguintes miRNAs: miR-126, miR-146a, miR-545, miR-24, miR-29a, miR-511, miR-365, miR-30d, miR-193a. Em nosso trabalho, a expressão destes miRNAs não estava alterada nas amostras da paciente em comparação às amostras do grupo controle. Essa diferença encontrada pode ser devido ao maior número de pacientes incluídos nos estudos

relatados e/ou por termos aceitado apenas miRNAs com valor de FC > 100 e valor de P < 0,0001.

Neste estudo, entre os miRNAs diferencialmente expressos, a expressão do miR-34a-5p estava aumentada (FC = 231) e a expressão do miR-765 (FC = 114) estava diminuída na paciente estudada em relação ao grupo controle. Zhang e colaboradores (2009) demonstraram alta expressão do miR-34a em pacientes pediátricos com LLA enquanto Musilova e Mraz (2014) demonstraram que os altos níveis deste miRNA levam a um bloqueio no desenvolvimento de células pró- para células pré-B, resultando na diminuição de células B maduras, devido a inibição do fator de transcrição FOXP1. Não existem estudos correlacionando o miR-765 com casos de LLA, porém diversos estudos mostraram que altos níveis de miR-765 contribuem para a tumorigênese de diferentes tipos de cânceres, como carcinoma de células escamosas do esôfago, osteossarcoma, carcinoma hepatocelular e mieloma múltiplo (JIANG et al., 2018; LIANG et al., 2017; LONG et al., 2019; XIE et al., 2016).

Devido ao alto valor de FC encontrado, o miR-455-3p destaca-se dos demais por sua exacerbada superexpressão. O miR-455-3p já foi avaliado como um potencial biomarcador para doença de Alzheimer (DA) e observou-se uma maior expressão deste miRNA em linfócitos B de pacientes com DA esporádica quando comparados a pacientes sem a doença (KUMAR; REDDY, 2018). Quando avaliado em casos de doenças oncológicas, como osteossarcoma e câncer de mama, a diminuição da expressão do mir-445-3p demonstrou ser um fator de pior prognóstico (GUO et al., 2018; YI et al., 2020). Em um estudo realizado por Chai e colaboradores (2018), a superexpressão do mir-455-3p em células de melanoma A375 inibiu a proliferação, migração e invasão de células, interrompeu o ciclo celular e levou a indução de morte das células por apoptose. Há poucos relatos na literatura sobre a expressão do miR-4697-5p, outro miRNA encontrado nas amostras da paciente que apresentou um valor de FC alto em comparação aos controles. Um dos estudos encontrados demonstrou a alta expressão do miR-4697-5p em casos de câncer de mama resistentes a quimioterápicos quando comparado aos casos não resistentes (LOU et al., 2018), enquanto Ren e colaboradores (2020) comprovaram que o miR-4697-5p encontra-se superexpresso em amostras de metástases de carcinoma de células escamosas bucal e é capaz de regular as metaloproteínas MMP7 e MMP13.

Neste relato de caso, dois miRNAs mais descritos na literatura relacionados a LLA-B, e que apresentaram valores de expressão alterados quando analisado pela técnica de microarranjo foram validados por RT-qPCR: o miR-708-5p e o miR-128-3p. O miR-708-5p

tem sido estudado por apresentar expressão desregulada em diversos tipos de tumores, tanto hematológicos quanto sólidos (MONTELEONE; LUTZ, 2017). Comumente, este miRNA encontra-se *upregulated* em casos de LLA, porém, quando a expressão do miR-708-5p é comparada entre os subtipos de LLA, os níveis de expressão em casos de LLA-B são relativamente maiores que em LLA-T. Esta diferença sugere um importante papel deste miRNA como biomarcador para diagnóstico diferencial (OLIVEIRA et al., 2014; SCHOTTE et al., 2008). Quando comparado entre os diferentes subtipos genéticos de LLA-B, o miR-708 demonstrou uma expressão de 8 a 9 vezes maior em pacientes com fusão gênica TCF3-PBX1 e TEL-AML1 que em casos com BCR-ABL, sugerindo que este miRNA está mais associado com subtipo leucêmico que com o estado de maturação celular (SCHOTTE et al., 2008). Por fim, em um estudo de revisão sistemática, o aumento da expressão do miR-708 foi correlacionado com um menor risco de recidiva, valores menores de doença residual mínima e a melhores índices de sobrevida, classificando este miRNA como um parâmetro de bom prognóstico (GUTIERREZ-CAMINO et al., 2020). Foram encontrados dois estudos diferentes que sugerem os mecanismos de ação envolvidos entre a pré-LLA-B e o miR-708. No primeiro, Li e colaboradores (2013) demonstraram que o miR-708 inibe a expressão dos genes do receptor do fator neutrófico ciliar (CNTFR), da proteína neuronatina (NNAT) e da proteína ligante do nucleotídeo guanina 12 (GNG12), o que contribui para a patogênese da leucemia pela inibição do fator inibidor de leucemia (LIF) e a ativação das vias de transdução de sinal JAK/STAT e das proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Já o segundo estudo sugere que o miR-708 atua sobre um gene supressor de tumor, a proteína 3 relacionada a Dickkop (DKK3), causando a proliferação de células leucêmicas por promoção do ciclo celular e inibição de apoptose (ZHANG et al., 2017).

Já foi previamente comprovada a capacidade do miR-128 de distinguir entre LLA e LMA (Leucemia Mieloide Aguda), visto que este miRNA encontra-se superexpresso em casos de LLA e com uma expressão diminuída em casos de LMA, tornando-se um importante biomarcador de diagnóstico (MI et al., 2007). Fulci e colaboradores (2009) também demonstraram que o miR-128 está preferencialmente expresso em os casos positivos para a fusão gênica TCF3-PBX1. Atualmente, sabe-se que o miR-128 tem como alvo a proteína de translocação 1 do linfoma de tecido linfoide associado a mucosa (MALT1) e o receptor de adenosina A2B, o que leva a inibição do desenvolvimento de células B e bloqueio da progressão do progenitor linfoide comum as células B maduras (GUTIERREZ-CAMINO et al., 2020).

Neste trabalho, verificou-se que dois genes estão mais envolvidos com os miRNAs descritos anteriormente, o gene CDKN1A, que é alvo dos miR-455-3p, miR-4697-5p e miR-708-5p, e o gene CCDC6, alvo dos miR-708-5p e miR-128-3. O gene CDKN1A codifica a proteína inibidora de cinase dependente de ciclina (CDKI), denominada p21, responsável pela interrupção da síntese de DNA e do ciclo celular pela inibição das cinases dependentes de ciclinas (CDK) (KREIS; LOUWEN; YUAN, 2019). A diminuição na expressão deste gene já foi descrita como fator prognóstico em diferentes doenças tumorais, inclusive, Roman-Gomez e colaboradores (2002) relataram que a metilação da p21 é um fator preditor de mau prognóstico em casos de LLA, tanto infantil quanto adulta. A baixa expressão deste gene também já foi associada a progressão tumoral em amostras de pacientes com Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL ou ATLL) (WATANABE et al., 2010). O gene CCDC6 atua em resposta ao dano no DNA, promovendo o controle do ciclo celular e a manutenção da estabilidade genômica ou, caso necessário, levando à apoptose. Relatos de caso descrevem este gene envolvido em duas translocações diferentes em leucemias, o primeiro relata um caso de LLA adulta com fusão entre os genes CCDC6 e RET (AXMI; GUPTA; GUPTA, 2019), e o segundo um caso de Leucemia Mieloide Crônica (LMC) com a fusão CCDC6-PDGFRB (YAMAZAKI et al., 2019). Merolla e colaboradores (2012) também identificaram que a perda de função do gene CCDC6 em tumores primários pode influenciar na estabilidade do genoma, contribuindo para o aumento da carcinogênese.

Por fim, há poucos dados na literatura que correlacionam TFC3-PBX1 em LLA-B com perfis de expressão de miRNAs, e entre os trabalhos analisados (GUTIERREZ-CAMINO et al., 2020; SCHOTTE et al. 2011), nenhum dos miRNAs citados foi encontrado alterado neste relato de caso. MiRNAs vem sendo estudados como eficazes biomarcadores para cânceres hematopoiéticos, porém, mais estudos precisam ser realizados para reforçar a expressão ou identificação de um novo perfil de miRNAs em casos mais específicos. Nas leucemias, os miRNAs podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico, escolha de tratamentos mais eficazes e específicos, identificação de possíveis resistências medicamentosas. Neste cenário, os miRNAs miR-455-3p e miR-4697-5p apresentam-se como possíveis alvos para novos estudos, já que foram pouco estudados até o momento e não apresentam relatos na literatura que os correlacione a casos de LLA. Outro miRNA que chama atenção é o miR-765, que também não possui relatos em casos de LLA, localiza-se no cromossomo 1 e diferentemente de outras doenças neoplásicas, apresentou uma baixa regulação em nosso estudo. Por fim, os miRNAs miR-708-5p, miR-128-3p e miR-34a-5p já foram descritos na literatura em casos de LLA e apresentaram um perfil de

expressão semelhante ao encontrado neste trabalho. Apesar da expressão destes miRNAs não ser específica para casos com TFC3-PBX1, os estudos mostraram uma expressão maior em pacientes com TFC3-PBX1 em relação a outras alterações gênicas. Sendo assim, sugere-se que os miRNAs miR-455-3p, miR-4697-5p, miR-708-5p, miR-128-3p e miR-34a-5p sejam alvos para novos estudos, incluindo um número maior de pacientes, como possíveis biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e/ou acompanhamento da LLA-B com TFC3-PBX1 t(1;19)(q23;p13).

Agradecimentos

Esse trabalho foi desenvolvido com apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESC (Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica de Santa Catarina).

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses

Referências

- ALMEIDA, Renata Santos et al. MicroRNA expression profiles discriminate childhood T-from B-acute lymphoblastic leukemia. **Hematological Oncology**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 103-112, 27 nov. 2018.
- YAMAZAKI, Miki *et al.* Myeloid/Lymphoid Neoplasm with PDGFRB Rearrangement with t(5;10)(q33;q22) Harboring a Novel Breakpoint of the CCDC6-PDGFRB Fusion Gene. **Internal Medicine**, [S.L.], v. 58, n. 23, p. 3449-3453, 1 dez. 2019.
- AXMI, Aishwarya; GUPTA, Pawan; GUPTA, Jeena. CCDC6, a gene product in fusion with different protooncogenes, as a potential chemotherapeutic target. **Cancer Biomarkers**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 383-393, 18 abr. 2019.
- CHAI, Li *et al.* MiR-497-5p, miR-195-5p and miR-455-3p function as tumor suppressors by targeting hTERT in melanoma A375 cells. **Cancer Management and Research**, [S.L.], v. 10, p. 989-1003, maio 2018.
- DE LIZ, Tania S. *et al.* Differential microRNA expression in childhood B-ALL with trisomy 8: a case report. **Gene Reports**, [S.L.], v. 21, p. 100973, dez. 2020.
- FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. DE. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas - In vitro diagnosis of acute lymphoid leukemias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 91-8, 2004.

FULCI, Valerio et al. Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles. **Genes, Chromosomes and Cancer**, [S.L.], v. 48, n. 12, p. 1069-1082, dez. 2009.

GUO, Jian *et al.* Identification of serum miR-1915-3p and miR-455-3p as biomarkers for breast cancer. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 0200716, 26 jul. 2018.

GUTIERREZ-CAMINO, Angela et al. MiRNA deregulation in childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. **Epigenomics**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 69-80, jan. 2020.

HRUŠÁK, O.; PORWIT-MACDONALD, A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. **Leukemia**, v. 16, n. 7, p. 1233–1258, jul. 2002.

JIANG, B. et al. Up-regulation of miR-765 predicts a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 3789-3794, jun. 2018.

KREIS; LOUWEN; YUAN. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. **Cancers**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1220, 21 ago. 2019.

KUMAR, Subodh; REDDY, P. Hemachandra. MicroRNA-455-3p as a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease: an update. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [S.L.], v. 10, p. 1-11, 23 fev. 2018.

LEE, Yong Sun; DUTTA, Anindya. MicroRNAs in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 199-227, fev. 2009.

LI, Xue et al. Retracted: overexpression of miR-708 and its targets in the childhood common precursor b-cell all. **Pediatric Blood & Cancer**, [S.L.], v. 60, n. 12, p. 2060-2067, 23 ago. 2013.

LIANG, Wei et al. MicroRNA-765 Enhances the Anti-Angiogenic Effect of CDDP via APE1 in Osteosarcoma. **Journal of Cancer**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1542-1551, 2017.

LONG, Shifeng et al. MicroRNA 765 is preregulated in multiple myeloma and serves an oncogenic role by directly targeting SOX6. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S.L.], v. 17, p. 4741-4747, 10 abr. 2019.

LOU, Weiyang et al. Identification of chemoresistance-associated miRNAs in breast cancer. **Cancer Management and Research**, [S.L.], v. 10, p. 4747-4757, out. 2018.

MEROLLA, Francesco *et al.* Loss of CCDC6, the First Identified RET Partner Gene, Affects pH2AX S139 Levels and Accelerates Mitotic Entry upon DNA Damage. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 36177, 24 maio 2012.

- MI, S. et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. **Proceedings Of The National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 50, p. 19971-19976, 4 dez. 2007.
- MONTELEONE, Nicholas J.; LUTZ, Carol S.. MiR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. **Oncotarget**, [S.L.], v. 8, n. 41, p. 71292-71316, 1 ago. 2017.
- MUSILOVA, K; MRAZ, M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. **Leukemia**, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 1004-1017, 26 dez. 2014.
- OLIVEIRA, Jaqueline Carvalho de et al. MiR-708-5p is differentially expressed in childhood acute lymphoblastic leukemia but not strongly associated to clinical features. **Pediatric Blood & Cancer**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 177-178, 11 set. 2014.
- PENG, Yong; CROCE, Carlo M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1, 28 jan. 2016.
- REN, Zhen-Hu et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and miRNAs in the metastasis of oral squamous cell carcinoma. **Bmc Oral Health**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 24, 29 jan. 2020.
- ROMAN-GOMEZ, Jose *et al.* 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21CIP1/WAF1/SDI1 gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [S.L.], v. 99, n. 7, p. 2291-2296, 1 abr. 2002.
- SCHOTTE, D et al. Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 313-322, 16 out. 2008.
- SCHOTTE, D. *et al.* MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, [S.L.], v. 96, n. 5, p. 703-711, 17 jan. 2011.
- SILVA, F. A. Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicação de infecções na sua patogênese. Rio de Janeiro (RJ): **Instituto Nacional de Câncer**, 2009
- SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, France. Revised 4th ed. Lyon: IARC, 2017.
- VROOMAN, Lynda M.; SILVERMAN, Lewis B.. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: prognostic factors and clinical advances. **Current Hematologic Malignancy Reports**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 385-394, 8 ago. 2016.
- WATANABE, Masaaki et al. Downregulation of CDKN1A in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma despite Overexpression of CDKN1A in Human T-Lymphotropic Virus 1-Infected Cell Lines. **Journal of Virology**, [S.L.], v. 84, n. 14, p. 6966-6977, 15 jul. 2010.

WIEMELS, J. L. et al. Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 99, n. 23, p. 15101-15106, 1 nov. 2002.

XIE, Bin-Hui et al. MiR-765 promotes cell proliferation by downregulating INPP4B expression in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Biomarkers**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 405-413, 30 mar. 2016.

YI, Xijun *et al.* MiR-455-3p downregulation facilitates cell proliferation and invasion and predicts poor prognosis of osteosarcoma. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 454, 2 out. 2020.

ZHANG, Hua et al. MicroRNA Patterns Associated with Clinical Prognostic Parameters and CNS Relapse Prediction in Pediatric Acute Leukemia. **Plos One**, [S.L.], v. 4, n. 11, p. 7826, 13 nov. 2009.

ZHANG, Yingjie et al. Suppression of miR-708 inhibits the Wnt/ β -catenin signaling pathway by activating DKK3 in adult B-all. **Oncotarget**, [S.L.], v. 8, n. 38, p. 64114-64128, 18 jul. 2017.

Material Suplementar

Expressão Diferencial de microRNAs em Paciente com Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B com Fusão Gênica TCF3-PBX1 Resultante da Translocação t(1;19)(q23;p13.3): Relato De Caso

Ana Gabriela Rosa¹; Tânia Souza de Liz¹, Júlia Cisilotto¹; Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, SC, Brasil

*Autor Correspondente:

Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Tel/Fax: (+55) (48) 32212200

e-mail: tania.pasa@ufsc.br

Tabela S1. Vias KEGG significativamente enriquecidas para os genes alvos do miR-708-5p e miR-128-3p

| Vias KEGG | Genes Alvos | Valor de P |
|---------------------------|--|---------------------|
| <i>Prostate cancer</i> | E2F3; EGFR; MTOR; IGF1; PDPK1; PIK3R1; MAP2K1; PTEN; SOS1; HSP90B1; CREB5; AKT1; AKT2; CCND1; BCL2; CDKN1A; IKBKG | 1.79E ⁻⁸ |
| <i>Pathways in cancer</i> | BAX; CASP3; RUNX1; E2F3; EGFR; MTOR; IGF1; JAK1; SMAD2; PIK3R1; MAP2K1; PTEN; PTGS2; RET; RXRA; SOS1; TGFBR1; HSP90B1; VEGFC; CCDC6; FZD9; FADD; WNT3A; AKT1; AKT2; BIRC5; CCND1; BCL2; CDKN1A; SMAD3; MMP2; IKBKG | 1.37E ⁻⁷ |
| <i>Colorectal cancer</i> | BAX; CASP3; SMAD2; PIK3R1; MAP2K1; TGFBR1; AKT1; AKT2; BIRC5; CCND1; BCL2; SMAD3 | 1.82E ⁻⁷ |
| <i>Pancreatic cancer</i> | BRCA2; E2F3; EGFR; JAK1; SMAD2; PIK3R1; MAP2K1; TGFBR1; VEGFC; AKT1; AKT2; CCND1; SMAD3; IKBKG | 2.11E ⁻⁷ |
| <i>Glioma</i> | E2F3; EGFR; MTOR; IGF1; PIK3R1; MAP2K1; PTEN; SOS1; AKT1; AKT2; CCND1; CDKN1A | 0,00000464 |

| | | |
|--|--|-----------|
| <i>Chronic myeloid leukemia</i> | RUNX1; E2F3; PIK3R1; MAP2K1; SOS1; TGFBR1; AKT1; AKT2; CCND1; CDKN1A; SMAD3; IKBKG | 0,0000162 |
| <i>Non-small cell lung cancer</i> | E2F3; EGFR; PDPK1; PIK3R1; MAP2K1; RXRA; SOS1; AKT1; AKT2; CCND1 | 0,0000204 |
| <i>Endometrial cancer</i> | EGFR; ILK; PDPK1; PIK3R1; MAP2K1; SOS1; AKT1; AKT2; CCND1 | 0,0000319 |
| <i>Cholinergic synapse</i> | FYN; GNAQ; ITPR1; KCNJ6; PIK3R1; MAP2K1; CREB5; GNB5; GNG12; AKT1; AKT2; BCL2 | 0,000231 |
| <i>mTOR signaling pathway</i> | MTOR; IGF1; PDPK1; PIK3R1; PRKAA1; VEGFC; AKT1; AKT2 | 0,000251 |
| <i>Acute myeloid leukemia</i> | RUNX1; MTOR; PIK3R1; MAP2K1; SOS1; AKT1; AKT2; CCND1; IKBKG | 0,000264 |
| <i>Adherens junction</i> | EGFR; FYN; SMAD2; SNAI2; SNAI1; TGFBR1; WASL; NECTIN4; SMAD3; PTPRJ | 0,000281 |
| <i>Fc epsilon RI signaling pathway</i> | MAPK14; FYN; PDK1; PIK3R1; PLA2G5; MAP2K1; SOS1; AKT1; AKT2; MAP2K3 | 0,000498 |
| <i>HTLV-I infection</i> | CANX; E2F3; JAK1; SMAD2; PIK3R1; TGFBR1; FZD9; CHEK2; WNT3A; AKT1; AKT2; CCND1; CCND3; CDKN1A; SMAD3; SRF; IKBKG; CRT3 | 0,000514 |
| <i>Focal adhesion</i> | ARHGAP5; EGFR; FYN; IGF1; ILK; PDPK1; PIK3R1; MAP2K1; RELN; PTEN; RAP1B; SOS1; VEGFC; AKT1; AKT2; CCND1; BCL2; CCND3 | 0,000546 |
| <i>Bladder cancer</i> | E2F3; EGFR; MAP2K1; RPS6KA5; CCND1; CDKN1A | 0,000656 |
| <i>Neurotrophin signaling pathway</i> | BAX; MAPK14; NTRK3; PDK1; PIK3R1; MAP2K1; RAP1B; SOS1; YWHAZ; RPS6KA5; BEX3; AKT1; AKT2 | 0,000746 |
| <i>Melanoma</i> | E2F3; EGFR; IGF1; PIK3R1; MAP2K1; AKT1; AKT2; CCND1; CDKN1A | 0,001 |
| <i>Chagas disease (American trypanosomiasis)</i> | MAPK14; GNAQ; SMAD2; PIK3R1; TGFBR1; FADD; AKT1; AKT2; SMAD3; IKBKG | 0,00192 |
| <i>Toxoplasmosis</i> | CASP3; MAPK14; JAK1; PDK1; PIK3R1; PPIF; AKT1; AKT2; MAP2K3; IKBKG | 0,00268 |
| <i>Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)</i> | BAX; CASP3; MAPK14; TOMM40L; BCL2; MAP2K3 | 0,00328 |
| <i>Thyroid cancer</i> | MAP2K1; RET; RXRA; CCDC6; CCND1 | 0,00372 |
| <i>T cell receptor signaling pathway</i> | MAPK14; FYN; PDK1; PIK3R1; MAP2K1; SOS1; NCK2; AKT1; AKT2; IKBKG | 0,00393 |

| | | |
|--|---|---------|
| <i>p53 signaling pathway</i> | BAX; CASP3; IGF1; PTEN; CHEK2; CCND1; CCND3; CDKN1A | 0,00406 |
| <i>Hepatitis C</i> | MAPK14; EGFR; JAK1; PDK1; PIK3R1; SOS1; AKT1; AKT2; CDKN1A; IKBKG | 0,00455 |
| <i>ErbB signaling pathway</i> | EGFR; MTOR; PIK3R1; MAP2K1; SOS1; NCK2; AKT1; AKT2; CDKN1A | 0,00561 |
| <i>Insulin signaling pathway</i> | MTOR; MKNK2; PDE3A; PDE3B; PDPK1; PIK3R1; PRKAA1; MAP2K1; SOS1; SREBF1 | 0,00578 |
| <i>Serotonergic synapse</i> | CASP3; GNAQ; ITPR1; KCNJ6; PLA2G5; MAP2K1; PTGS2; GNB5; GNG12 | 0,00605 |
| <i>Gap junction</i> | EGFR; GNAQ; ITPR1; MAP2K1; SOS1; TUBB4B; TUBB2A; TUBB4A; TUBB | 0,00651 |
| <i>Renal cell carcinoma</i> | PIK3R1; MAP2K1; RAP1B; SOS1; VEGFC; AKT1; AKT2 | 0,00741 |
| <i>GnRH signaling pathway</i> | MAPK14; EGFR; GNAQ; ITPR1; PLA2G5; MAP2K1; SOS1; MMP2; MAP2K3 | 0,00926 |
| <i>Dorso-ventral axis formation</i> | EGFR; MAP2K1; SOS1 | 0,00938 |
| <i>Pathogenic Escherichia coli infection</i> | WASL; TUBB4B; TUBB2A; TUBB4A; TUBB | 0,00989 |
| <i>Progesterone-mediated oocyte maturation</i> | MAPK14; IGF1; PDE3A; PDE3B; PIK3R1; MAP2K1; AKT1; AKT2 | 0,0108 |
| <i>Small cell lung cancer</i> | E2F3; PIK3R1; PTEN; PTGS2; AKT1; AKT2; CCND1; IKBKG | 0,0108 |
| <i>MAPK signaling pathway</i> | CASP3; MAPK14; EGFR; MKNK2; PLA2G5; MAP2K1; RAP1B; SOS1; STK3; TGFBR1; MAPKAPK5; RPS6KA5; GNG12; AKT1; AKT2; MAP2K3; SRF; IKBKG | 0,0118 |
| <i>Jak-STAT signaling pathway</i> | JAK1; LIFR; PIK3R1; SOS1; AKT1; AKT2; CCND1; CCND3; CNTFR | 0,0128 |
| <i>Apoptosis</i> | BAX; CASP3; PIK3R1; FADD; AKT1; AKT2; BCL2; IKBKG | 0,0133 |
| <i>Osteoclast differentiation</i> | MAPK14; CSF1; FYN; JAK1; PIK3R1; MAP2K1; TGFBR1; LILRB5; AKT1; AKT2 | 0,015 |
| <i>Cell cycle</i> | E2F3; SMAD2; WEE1; YWHAZ; STAG1; CHEK2; CCND1; CCND3; CDKN1A; SMAD3 | 0,0195 |
| <i>Dopaminergic synapse</i> | MAPK14; GNAQ; ITPR1; KCNJ6; KIF5B; CREB5; GNB5; GNG12; AKT1; AKT2 | 0,0195 |
| <i>Epstein-Barr virus infection</i> | MAPK14; JAK1; PIK3R1; AKT1; AKT2; CDKN1A; MAP2K3; IKBKG | 0,0222 |
| <i>VEGF signaling pathway</i> | MAPK14; PIK3R1; PLA2G5; MAP2K1; PTGS2; AKT1; AKT2 | 0,0252 |

| | | |
|--|---|--------|
| <i>Chemokine signaling pathway</i> | CCR4; PIK3R1; MAP2K1; RAP1B; CCL17; SOS1; WASL; GNB5; GNG12; AKT1; AKT2; CXCL5; IKBKG | 0,0279 |
| <i>Carbohydrate digestion and absorption</i> | PIK3R1; AKT1; AKT2 | 0,0294 |
| <i>Sphingolipid metabolism</i> | GBA; UGCG; SGPL1; CERK; SGPP1 | 0,0298 |
| <i>Aldosterone-regulated sodium reabsorption</i> | FXYD2; IGF1; PDPK1; PIK3R1 | 0,0392 |
| <i>Prion diseases</i> | BAX; FYN; MAP2K1 | 0,0441 |

Tabela S2. Vias KEGG significativamente enriquecidas para os genes alvos do miR-455-3p e miR-4697-5p

| KEGG Pathways | Genes Alvos | Valor de P |
|--|---|-------------------|
| <i>mRNA surveillance pathway</i> | PPP2R2A; PAPOLA; PAPOLG; MSI1; DDX39B; DAZAP1; GSPT1; PPP2R1A; SMG7; CPSF7; SMG1; NUDT21 | 0,00599 |
| <i>One carbon pool by folate</i> | MTHFD1; MTHFD2; MTFMT; ATIC; GART | 0,00602 |
| <i>Shigellosis</i> | ACTB; WASF2; ARPC1B; VCL; FBXW11; MAPK8; PFN1; U2AF1 | 0,00963 |
| <i>p53 signaling pathway</i> | CCNB1; CDKN1A; CDKN2A; IGF1; THBS1; EI24; BBC3; STEAP3; TP73; IGFBP3 | 0,0113 |
| <i>Cell cycle</i> | ABL1; CCNB1; CDKN1A; CDKN2A; HDAC2; MYC; TFDP2; YWHAZ; CDC45; CDC14B; MCM6; YWHAH; MAD2L1; PLK1; YWHAG | 0,0133 |
| <i>RNA transport</i> | EF1A1; EIF4E; EIF4G1; KPNB1; SUMO2; EIF3D; EIF2B2; NUP155; DDX39B; EIF1; XPO1; THOC5; EIF1B; RAN; SENP2 | 0,0152 |
| <i>Oocyte meiosis</i> | CCNB1; IGF1; YWHAZ; CHP1; CALM3; RPS6KA2; FBXW11; PPP2R1A; FBXO5; YWHAH; MAD2L1; PLK1; YWHAG | 0,0212 |
| <i>Ribosome biogenesis in eukaryotes</i> | PWP2; RRP7A; GNL3L; UTP4; IMP4; WDR3; XPO1; RAN | 0,0238 |
| <i>Pentose phosphate pathway</i> | ALDOA; PFKP; PRPS1; PRPS1L1; PFKL | 0,0273 |
| <i>SNARE interactions in vesicular transport</i> | STX2; STX4; STX7; STX16; STX1A | 0,0273 |
| <i>Salmonella infection</i> | ACTB; DYNC1H1; WASF2; PLEKHM2; ARPC1B; MYH9; MAPK8; PFN1; FLNC | 0,0412 |

MATERIAIS E MÉTODOS

As análises de microarranjo e RT-qPCR fazem parte da tese de doutorado da aluna Tania Souza de Liz (DE LIZ, 2020). Para este trabalho foi realizada uma nova análise dos dados de microarranjo e RT-qPCR utilizando apenas a amostra do paciente com LLA-B com TCF3-PBX1 t(1;19) (q23; p13.3).

Primeiramente, foi realizada a separação das células mononucleares por gradiente de densidade, utilizando a solução Histopaque® 1077 (Densidade: 1.077 g/mL) (Sigma-Aldrich, Darmstat, Alemanha). Em seguida, o RNA total das células mononucleares obtido das amostras foi extraído e purificado utilizando-se o kit miRVana™ miRNA Isolation (Ambion Life Technologies, Austin, TX, USA), a quantificação do RNA total foi realizada por análise no espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences, UK) e a avaliação da integridade do RNA total das amostras foi feita por meio de técnica de eletroforese microfluídica com o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, EUA). Para avaliação do perfil de expressão dos miRNAs foi utilizada a técnica de microarranjo, com lâminas do tipo G3 *Human miRNA Microarray* (G4870C - Agilent Technologies, California, EUA) contendo 2.549 seqüências de miRNAs referentes à versão 21 da base de dados de miRBase e 21 controles internos. Todas as análises foram realizadas seguindo os protocolos recomendados por seus respectivos fabricantes. A leitura das lâminas foi feita pelo equipamento SureScan Microarray Scanner (G4900DA, Agilent Technologies, California, EUA) e os dados foram obtidos por meio do programa Feature Extraction para análise subsequente dos miRNAs no programa GeneSpring (G4460-90053 e G5886AA - Agilent Technologies, California, EUA).

Os genes alvo dos miRNAs selecionados para análise de bioinformática foram preditos pelo programa miRTarBase v.8.0 (HUANG et al., 2019) que é um banco de dados de interação miRNA-alvo validado experimentalmente. Além disso, a análise de rede de interações dos genes alvo foi realizada utilizando o programa miRNet v.2.0 (CHANG et al., 2020).

Referências do Material Suplementar

CHANG, Le et al. MiRNet 2.0: network-based visual analytics for mirna functional analysis and systems biology. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 244-251, 2 jun. 2020.

DE LIZ, Tania Souza. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNAs COMO BIOMARCADORES PARA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL DE CÉLULAS B – LLA-B. 2020. 73 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020

HUANG, Hsi-Yuan et al. MiRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA:target interaction database. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 48, p. 148-154, 24 out. 2019.