



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**IMPACTO DE POLIMORFISMOS EM MICRORNAS E COMPONENTES
DA SUA BIOGÊNESE NA SUSCEPTIBILIDADE A LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA.**

TATIANE PIEDADE DE SOUZA

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia molecular.

Orientador: Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos

**BELÉM
MARÇO – 2020**

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituições:

Universidade Federal do Pará (UFPA)

- Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO)
- Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM)
- Hospital Ophir Loyola (HOL)
- Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo

Fonte Financiadora:

- Projeto aprovado no Edital da chamada Universal- CNPq N14/2013
- Bolsa de estudo: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

P613i PIEDADE DE SOUZA, TATIANE
IMPACTO DE POLIMORFISMOS EM MICRORNAS E
COMPONENTES DA SUA BIOGÊNESE, NA
SUSCEPTIBILIDADE A LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA. / TATIANE PIEDADE DE SOUZA. — 2020.
70 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

1. Leucemia Linfoblástica Aguda. 2. microRNAs. 3.
Polimorfismo de nucleotídeo único;. 4. Susceptibilidade..
I. Título.

CDD 573.215

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrada minha enorme gratidão a Deus, que esteve, está e estará sempre comigo. Sou grata por me permitir conhecer e sentir seu amor, e por ter me ensinado durante momentos alegres e tristes. Ele foi e sempre será a maior e melhor decisão que já tomei.

Um agradecimento mais que especial aos meus pais, Jackline Piedade e Jonas Souza por acreditarem em mim e sempre incentivarem meus sonhos e os sonhos do meu irmão, Thiago (a quem também sou grata pelo companheirismo e amor). Eles são os principais e mais belos motivos das minhas vitórias. Agradeço também aos meus pais do coração, Samantha e Marcos. Amigos que Deus me permitiu conhecer e escolher para estar perto nessa caminhada. Muito obrigada pela fiel amizade!

Agradeço ao meu orientador, Ney Pereira Carneiro dos Santos, por me dar a oportunidade de ingressar na ciência e compreender os caminhos da pesquisa científica, a qual eu aprendi a amar. Obrigada, professor, pela paciência, empenho e ensinamentos, os quais jamais esquecerei!

Gostaria de agradecer a todos os amigos que fiz no NPO, pelo apoio e pelo compartilhar de momentos ímpares. Aprendi demais com cada um. Que o grupo se fortaleça e se destaque cada vez mais. Muito obrigada!

Deixo aqui um agradecimento especial a algumas pessoas que me ajudaram demais no processo final do mestrado e no incentivo para continuar e alçar voos mais altos. Amanda Cohen, Darlen Carvalho, Roberta Borges, Lucas Favacho e Amanda Vidal, vocês são uma fonte enorme de inspiração para mim dentro e fora do mundo acadêmico e científico. Obrigada!

Ao Furonas FC, que tornaram os últimos meses do mestrado mais leves, alegres e emocionantes. Sou grata por terem me acolhido tão bem dentro e fora de campo.

Por fim, agradeço aos órgãos e instituições financiadoras e de incentivo à pesquisa por tornarem possível a ciência no Brasil, em especial nas universidades públicas.

Sumário

LISTA DE ABREVIACÕES	6
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda	11
1.1.1. Epidemiologia da LLA.....	12
1.1.2. Clínica da LLA	12
1.1.3. Diagnóstico da LLA.....	13
1.1.4. Genética da LLA	18
1.1.5. Suscetibilidade à LLA	22
1.1.6. Estudos genômicos em miscigenados e as diferenças étnicas na LLA	24
1.2. MicroRNAs	26
1.2.1. Biogênese e Função dos MicroRNAs	26
1.2.2. Alterações em microRNAs e seu papel na oncogênese	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. CAPÍTULO I - ARTIGO.....	33
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	43
MATERIAL SUPLEMENTAR	45
4. DISCUSSÃO GERAL.....	46
5. REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS	64
ANEXO I - Pharmacogenomics and variations in the risk of toxicity during the consolidation/maintenance phases of the treatment of pediatric B-cell leukemia patients from an admixed population in the Brazilian Amazon. (2018).	65
ANEXO II - Association of genes ARID5B, CEBPE and folate pathway with acute lymphoblastic leukemia in a population from the Brazilian Amazon region. (2019).	66
ANEXO III - The Metabolization Profile of the CYP2D6 Gene in Amerindian Populations: A Review. (2020).	67
ANEXO IV - Parecer do comitê de ética e pesquisa.....	68

LISTA DE ABREVIACÕES

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda
OMS – Organização Mundial da Saúde
INCA – Instituto Nacional do Câncer
SNC – Sistema Nervoso Central
LMA – Leucemia Mielóide Aguda
CID-10 – Código Internacional de Doenças
FAB – French-American-British
PAS – Ácido Periódico de Schiff
MPO – Mieloperoxidase
EGIL – Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias
LLA-B – Leucemia Linfoblástica Aguda Precursora de Células B
LLA-T – Leucemia Linfoblástica Aguda Precursora de Células T
PAX5 – Proteína Ativadora Específica de Células B
SNPs – Polimorfismos de Nucleotídeo Único
NGS – Sequenciamento de Nova Geração
IAM – Marcadores Informativos de Ancestralidade
miRNAs – MicroRNAs
pri-miRNAs – MicroRNAs Primárias
pré-miRNAs – Precursores de Micro-RNA
RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
mRNA – RNA mensageiro
MRE – Elementos de Resposta ao MicroRNA
miR-SNP – Polimorfismos de Nucleotídeo Único Associados aos MicroRNAs
CNS – Conselho Nacional de Saúde
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
MAF – Frequência do Menor Alelo
EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC - Intervalo de Confiança de 95%
OR – *Odds Ratio*

DP – Desvio Padrão

GWAS – Estudo de Associação Genômica Ampla

LLC – Leucemia Linfóide Crônica

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Variantes morfológicas comuns na LLA.....	16
Figura 2. Variantes morfológicas raras na LLA.....	17
Figura 3. Frequências estimadas de todos os subtipos genéticos específicos da infância.....	21
Figura 4. Biogênese dos microRNAs.....	27
Figura 5. Mecanismo funcional dos microRNAs.....	27
Figura 6. Mecanismo de ação supressora e oncogênica tumoral de miRNAs no contexto da biogênese de miRNA.....	29
Figura 7. Fatores que afetam a transcrição dos genes de microRNAs.....	30

TABELAS

Tabela 1. Critérios morfológicos para a classificação entre linfoblastos leucêmicos.....	15
Tabela 2. Categorias da Leucemia Linfoblástica dos tipos B e T de acordo com a OMS.....	22

Tabelas do artigo:

Tabela 1. Distribuição dos dados demográficos entre os grupos caso e controle.....	38
Tabela 2. Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos investigados.....	39
Tabela S1. Caracterização dos polimorfismos estudados e controle de qualidade.....	45

RESUMO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo de câncer que mais acomete crianças no mundo, representando 75% das leucemias agudas e aproximadamente 35% de todas as neoplasias malignas pediátricas. Acredita-se que a etiologia da LLA é multifatorial, com envolvimento de fatores ambientais e genéticos. Neste contexto, polimorfismos que alteram a função normal de microRNAs em genes relacionados a etiologia da LLA, vêm sendo recentemente amplamente investigados. No entanto, dados sobre esses polimorfismos em populações miscigenadas, como a população amazônica brasileira, são escassos na literatura. O objetivo desse estudo foi investigar o papel de 10 polimorfismos em genes de microRNAs e genes envolvidos na maquinaria de síntese dos microRNAs na susceptibilidade à LLA infantil. A mostra foi composta por 100 pacientes com LLA, atendidos no setor de oncologia pediátrica do Hospital Ophir Loyola e Octavio Lobo e 180 indivíduos saudáveis, não aparentados entre si, utilizados como controle no estudo. A genotipagem dos polimorfismos estudados utilizou a plataforma *QuantStudio™–TaqMan® OpenArray™*. As análises estatísticas foram realizadas empregando programa estatístico SPSS v.25.0. Todos os testes estatísticos foram baseados em uma probabilidade bicaudal e um p valor $< 0,05$ foi considerado significativo. Dos genes envolvidos na maquinaria de síntese dos microRNAs, apenas o polimorfismo rs3805500 no gene *DROSHA* foi estatisticamente significativo, os pacientes que exibiram o genótipo homozigoto mutante (AA) apresentaram um risco de quase 3 vezes maior de desenvolver LLA quando comparados aos outros genótipos ($p = 0,004$, OR= 2,913, IC= 1,415 - 5,998). Em relação aos polimorfismos em genes de microRNAs, para a variante rs3746444 presente no gene *MIR499A*, o genótipo homozigoto mutante foi associado a um risco de LLA aumentado em aproximadamente 17 vezes ($P < 0,001$, OR= 17,797, IC= 5,55 – 57,016). Ademais, foi observado um efeito protetor ao desenvolvimento de LLA associado ao genótipo homozigoto selvagem do polimorfismo rs2505901 do gene *MIR938*. Nossos resultados evidenciam que os polimorfismos genéticos presentes em moléculas regulatórias, como os microRNAs e genes envolvidos na sua síntese, são importantes na regulação do risco de desenvolver LLA na população estudada. Esperamos que os resultados encontrados no presente trabalho ajudem na compreensão mais ampla da etiologia da LLA.

Palavras chave: Leucemia Linfoblástica Aguda; microRNAs; Polimorfismo de nucleotídeo único; Susceptibilidade.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the type of cancer that most affects children in the world, representing 75% of acute leukemias and approximately 35% of all as pediatric malignancies. Believe if the etiology of ALL is multifactorial, involving environmental and genetic factors. In this context, polymorphisms that alter the normal function of microRNAs in genes related to the etiology of ALL, have been recently extensively investigated. However, data on these polymorphisms in mixed populations, such as the Brazilian Amazonian population, are scarce in the literature. The aim of this study was to investigate the role of 10 polymorphisms in microRNA genes and genes involved in the microRNA synthesis machinery in susceptibility to childhood ALL. The sample consisted of 100 patients with ALL, treated in the pediatric oncology sector of Hospital Ophir Loyola and Octavio Lobo and 180 healthy individuals, unrelated, used as controls in the study. The genotyping of the studied polymorphisms used the QuantStudio™ –TaqMan® OpenArray™ platform. Statistical analyzes were performed using the SPSS v.25.0 statistical program. All statistical tests were based on a two-tailed probability and a p-value <0.05 was considered significant. Of the genes involved in the microRNAs synthesis machinery, only the rs3805500 polymorphism in the DROSHA gene was statistically significant, patients who exhibited the homozygous mutant (AA) genotype had an almost 3 times greater risk of developing ALL when compared to the other genotypes ($p = 0.004$, OR = 2.913, CI = 1.415 - 5.998). Regarding the polymorphisms in microRNA genes, for the rs3746444 variant present in the MIR499A gene, the homozygous mutant genotype was associated with an approximately 17-fold increased risk of ALL ($P < 0.001$, OR = 17.797, CI = 5.55 - 57.016). In addition, a protective effect on the development of ALL was observed associated with the wild homozygous genotype of the polymorphism rs2505901 of the MIR938 gene. Our results show that the genetic polymorphisms present in regulatory molecules, such as microRNAs and genes involved in their synthesis, are important in regulating the risk of developing ALL in the studied population. We hope that the results found in the present work will help in a broader understanding of the etiology of ALL.

Palavras chave: Acute Lymphoblastic Leukemia; microRNAs; Single Nucleotide Polymorphism; Susceptibility.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é caracterizada como a transformação maligna de células progenitoras de linfócitos das linhagens B e T na medula óssea. Essa transformação é acompanhada pela proliferação exacerbada de linfoblastos (linfócitos imaturos) que acabam substituindo as células sanguíneas saudáveis na medula. Além disso, por não atingirem a maturidade, essas células não realizam suas funções de maneira adequada e podem se estender ao sangue periférico (HOWLADER, 2017; TERWILLIGER 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em conjunto com a Associação Europeia de Hematopatologia e a Sociedade de Hematologia publicaram, em 2008, *Classificação da OMS de tumores de tecidos hematopoiéticos e linfoides*, conhecido como “*Blue book*”, que classifica as leucemias e linfomas de acordo com informações clínicas, características citoquímicas, imunofenotípicas, morfológicas e de genética molecular das células. De acordo com essa classificação, as neoplasias hematológicas linfoides são definidas como “Leucemia linfoblástica B/linfoma” e “Leucemia linfoblástica T/linfoma” (SWERDLOW 2008; VARDIMAN 2009).

Após a publicação da OMS em 2008, foram identificados muitos fatores moleculares com o potencial de gerar novas perspectivas em relação ao diagnóstico e prognóstico das neoplasias hematopoiéticas, bem como a melhor caracterização de dados morfológicos importantes para a diferenciação entre os diversos grupos dessas neoplasias. Por esse motivo, em 2016 a OMS publicou uma atualização para os subtipos de neoplasias mieloides e linfoides agudas, a qual contou com novos dados citogenéticos e genéticos presentes na literatura. No entanto, uma nova versão do “*Blue book*” ainda não foi publicada, mas espera-se que muitas dessas características recém descobertas sejam incluídas nos critérios de classificação (ARBER, 2016).

1.1.1. Epidemiologia da LLA

A LLA é o tipo de câncer que mais acomete crianças em todo o mundo, representando 75% das leucemias agudas e aproximadamente 28% de todas as neoplasias malignas na infância (PUI *et al*, 2011; WARD *et al*, 2014). Essa neoplasia acomete principalmente crianças de 1 a 5 anos, com pico de incidência entre 2 a 3 anos de idade, onde predomina em indivíduos do sexo masculino (INCA, 2017; HUNGER, 2015).

No Brasil, a leucemia é a principal causa de óbitos por câncer em crianças e adolescentes (de 0 a 19 anos). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que ocorrerão 5.920 novos casos de leucemia em homens e 4.890 em mulheres, para cada ano do triênio 2020-2022. Este dado corresponde a um risco estimado de 5,67 novos casos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres no país (INCA, 2020).

Desconsiderando os cânceres de pele não melanoma, em homens a leucemia representa o quinto tipo de câncer mais frequente na Região Norte (4,45/100 mil habitantes), na Região Nordeste ocupa a sétima posição (5,02/100 mil habitantes), seguida da Região Sul (8,34/100 mil habitantes) com a décima posição. Nas demais regiões, Sudeste (5,70/100 mil) e Centro-Oeste (4,29/100 mil) é a décima primeira mais frequente. No que diz respeito às mulheres, a LLA é a sexta mais frequente nas Regiões Norte (3,55/100 mil) e Sul (7,76/100 mil). Na Região Nordeste (4,06/100 mil), ocupa a décima posição. Na Região Centro-Oeste é a décima primeira (3,85/100 mil) e na Região Sudeste (4,15/100 mil habitantes) é a décima segunda mais frequente (INCA, 2020). A alta incidência da LLA tornou necessária a busca por conhecimento a respeito das suas manifestações clínicas e da sua etiologia, afim de identificar precocemente a doença e desenvolver melhores estratégias terapêuticas.

1.1.2. Clínica da LLA

As manifestações clínicas da LLA estão diretamente relacionadas com a carga leucêmica e a diminuição da produção normal de elementos da medula óssea, conduzindo o paciente a um quadro de citopenia. Dentre as principais

manifestações clínicas estão a letargia, palpitações e fadiga (como resultado da anemia); dor nos ossos e articulações e sangramento principalmente cutâneo e mucoso (devido a trombocitopenia); desenvolvimento de algumas infecções secundárias, como a gengivite (favorecidas pelo quadro de neutropenia); e hiperleucocitose em aproximadamente 15% dos casos, nos quais ainda que pouco frequente, é possível haver hemorragia em outros sítios, como no Sistema Nervoso Central (SNC) e no trato gastrointestinal. Além disso, outras anormalidades laboratoriais são bastante frequentes como variações nos níveis séricos de ácido úrico e lactose desidrogenase, ambos relacionados a carga e grau de lise tumoral (PUI, *et al.* 2006; ONCIU, *et al.* 2009).

As células leucêmicas podem se infiltrar em alguns locais extra medulares, dos quais destacam-se os gânglios linfáticos, o fígado e o baço e comumente podem se infiltrar em tecidos orbitais, tais como testículos, amídalas e adenoides. Infiltrações no SNC são pouco comuns e são em sua maioria assintomáticas, embora alguns pacientes apresentem dor de cabeça e vômito. Aproximadamente 25-30% dos pacientes podem apresentar lesões na pele ocasionadas pela infiltração cutânea das células leucêmicas (PUI, *et al.* 2006). Com base nas características clínicas e laboratoriais da doença, é possível desenvolver melhores estratégias para alcançar um diagnóstico precoce e eficiente.

1.1.3. Diagnóstico da LLA

Os padrões atuais utilizados para o diagnóstico da LLA incluem dados morfológicos das células, imunofenotípicos e de genética/citogenética, de acordo com descrições da OMS para classificação das leucemias linfoides. De acordo com esses critérios, é possível classificar as leucemias linfoides em duas categorias principais: Leucemia/linfoma linfoblástico de células B e Leucemia/linfoma linfoblástico de células T (ARBER, *et al.* 2016).

A designação leucemia/linfoma reflete a ideia de que essas neoplasias devem ser classificadas de acordo com as características biológicas e moleculares, independentemente do local de envolvimento. Quando se fala em variante leucêmica, mostra-se o envolvimento difuso do sangue periférico e da

medula óssea, enquanto o linfoma está confinado a locais nodais ou extranodais, sem ou com envolvimento mínimo da medula óssea (ARBER, *et al.* 2016).

Com relação à forma leucêmica, a medula óssea deve conter pelo menos 20% de blastos alterados. A apresentação puramente leucêmica é típica da LLA de linhagem B (85%), enquanto os casos de leucemia de linhagem T, além dos blastos leucêmicos, frequentemente apresentam uma massa linfomatosa no mediastino ou em outros locais. Entretanto, na maioria dos casos, apenas a presença de blastos leucêmicos não é suficiente para distinguir entre as linhagens B e T da leucemia, sendo necessário o uso de critérios morfológicos, imunofenotípicos e genéticos (CHIARETTI, *et al.* 2014).

1.1.3.1 Morfologia da LLA

Atualmente, a análise de citometria de fluxo representa o padrão ouro no diagnóstico morfológico da LLA, que permite identificar a linhagem celular e a definição do subgrupo. A avaliação morfológica de células da medula óssea é, portanto, o primeiro passo na via diagnóstica na LLA (LAI, *et al.* 2000). A tabela 1 mostra os critérios morfológicos que são usados para identificar linfoblastos. Adicionalmente, a análise morfológica de células da medula é indispensável, pois a morfologia das células leucêmicas do sangue periférico pode ser significativamente diferente daquela da medula óssea (D'ONOFRIO G, *et al.* 2014).

Apesar da análise morfológica ser padrão ouro para distinguir entre LLA e LMA, não há critérios morfológicos definidos para diferenciar a LLA de linhagem B e LLA de linhagem T. Além disso, também pode ser difícil a distinção entre linfoblastos de linhagem B dos precursores normais de linhagem B (conhecidas como hematogôneas) que podem ser observados no sangue periférico em diversas condições como mielofibrose primária e em crianças na fase de recuperação após a quimioterapia (SEVILLA, *et al.* 2010).

Tabela 1. Critérios morfológicos para a classificação de linfoblastos leucêmicos. (Traduzida de: d'Onofrio G, *et al.* 2014).

Linfoblastos	
Características Gerais	Populações de blastos tendem a ser homogêneas.
Tamanho	Variável, principalmente pequeno
Núcleo	Central, principalmente redondo; as vezes é recuado particularmente na forma em adultos; Relação nucleocitoplasmática muito alta na forma que acomete crianças e menor na forma que ocorre em adultos.
Cromatina	Fina, com condensação dispersa. Muito condensada em linfoblastos pequenos.
Nucléolo	Ausente em linfoblastos pequenos; as vezes indistinto.
Citoplasma	Escasso, basofílico; Às vezes com uma projeção longa única (“célula espelho de mão”)
Granulos	Raramente presente, azurófilo e sempre negativo para peroxidase, esterases e azul de toluidina
Bastonete de Auer	Sempre ausente
Vacuolação	Pode ser presente

Dentre as principais diferenças morfológicas entre hematogôneas e linfoblastos leucêmicos estão a presença de uma cromatina mais homogênea com ausência de nucléolos visíveis nas hematogôneas, além de expressarem o antígeno CD10. A expressão de outros antígenos também é utilizada para diferenciar essas linhagens celulares através da investigação imunofenotípica dessas células (SEVILLA, *et al.* 2010). De acordo com a French-American-British (FAB), grupo que publicou a primeira classificação para leucemias agudas, a morfologia da medula óssea da LLA é bastante variável. A FAB classifica a LLA em três grupos morfológicos distintos: L1, L2 e L3 (Figura 1). Dentre as variantes morfológicas mais comuns estão as classificações FAB L1 e FAB L2. O subtipo FAB L1 apresenta blastos leucêmicos pequenos ou intermediários, cromatina nuclear condensada, citoplasma escasso e nucléolo indistinto ou ausente (Fig. 1A). O subtipo FAB L2 é menos comum, com blastos leucêmicos um pouco maiores com quantidades moderadas de citoplasma basofílico claro, cromatina nuclear levemente dispersa e nucléolos proeminentes (Fig. 1B). O subtipo mais

raro é o FAB L3, no qual a maioria são linfomas de burkitt, um subtipo de linfoma de células B maduras. Nesse subtipo os linfoblastos são muito grandes e homogêneos, com cromatina nuclear aglutinada e nucléolos proeminentes (Fig. 1C) (FLANDRIN *et al.*, 1976; BENNETT *et al.*, 1981; ONCIU, 2009; CHIARETTI, *et al.* 2014).

Atualmente, outras variantes morfológicas raras também são descritas na LLA (Figura 2), como "*hand-mirror cells*" na qual a forma da célula se assemelha a um espelho de mão ou raquete de tênis onde apresentam uma pequena projeção citoplasmática. Essas células apresentam grânulos citoplasmáticos azurofílicos que variam em número, tamanho e forma (Fig. 2A). Citoquimicamente, esses blastos também apresentam reações negativas de peroxidase e positividade variável de ácido periódico de Schiff (PAS). Além disso, a LLA também está associada a hipereosinofilia (Fig. 2B) e, por definição, os blastos leucêmicos são negativos para mieloperoxidase (MPO) (Fig. 2C) (CHIARETTI, *et al.* 2014).

Figura 1. Variantes morfológicas comuns na LLA. (Adaptada de: CHIARETTI, *et al.* 2014)

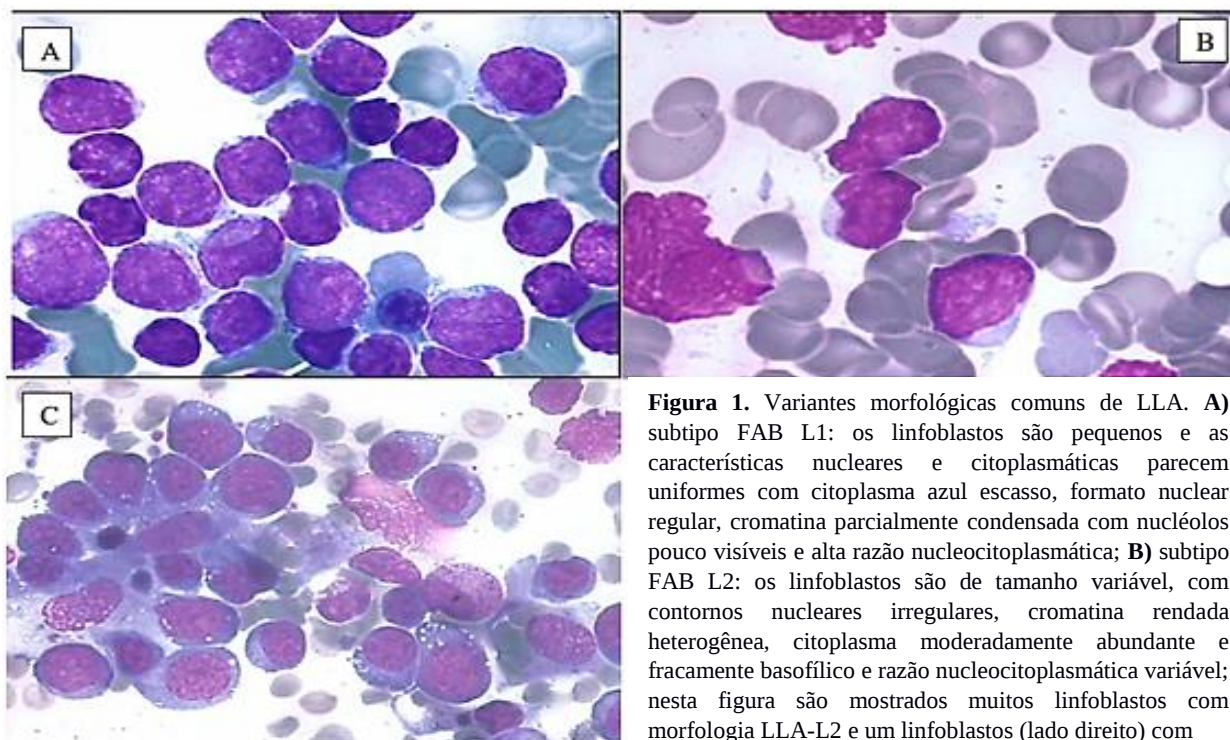
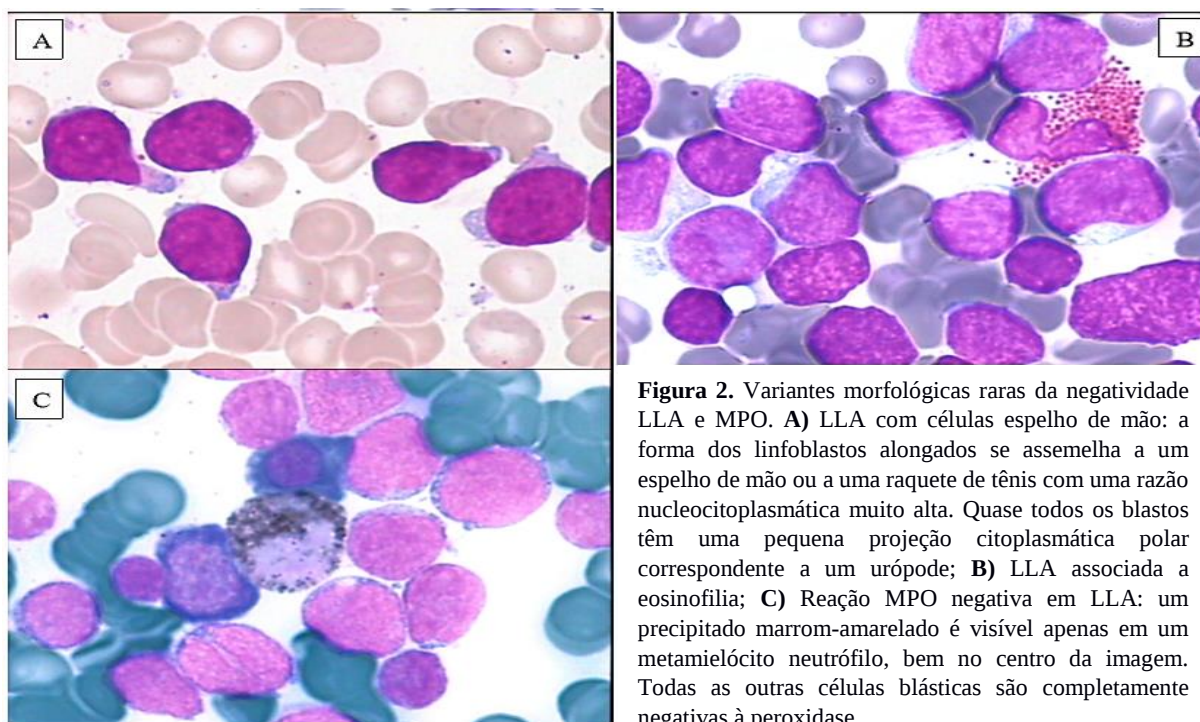


Figura 1. Variantes morfológicas comuns de LLA. **A)** subtipo FAB L1: os linfoblastos são pequenos e as características nucleares e citoplasmáticas parecem uniformes com citoplasma azul escasso, formato nuclear regular, cromatina parcialmente condensada com nucléolos pouco visíveis e alta razão nucleocitoplasmática; **B)** subtipo FAB L2: os linfoblastos são de tamanho variável, com contornos nucleares irregulares, cromatina rendada heterogênea, citoplasma moderadamente abundante e fracamente basofílico e razão nucleocitoplasmática variável; nesta figura são mostrados muitos linfoblastos com morfologia LLA-L2 e um linfoblastos (lado direito) com

grânulos citoplasmáticos azofílicos grosseiros. **C)** subtipo FAB L3 (Burkitt): os linfoblastos são muito grandes e bastante homogêneos com cromatina nuclear pontilhada finamente granular com nucléolos proeminentes. O citoplasma é azul da "meia-noite" e é vacuolado; a maioria desses casos agora é reconhecida como representando linfoma não-Hodgkin em vez de LLA.

Figura 2. Variantes morfológicas raras na LLA. (Adaptada de: CHIARETTI, *et al.* 2014)



1.1.3.2. Imunofenotipagem da LLA

A diagnóstico imunofenotípico permite a classificação da linhagem celular e do seu estágio de diferenciação, dividindo a LLA em duas categorias: LLA precursora de células B (LLA-B) e LLA precursora de células T (LLA-T) (ONCIU, 2009; CHIARETTI, *et al.* 2014). Essa classificação foi criada pelo Grupo Europeu de Classificação imunológica das Leucemias (EGIL) e se baseia na expressão de antígenos específicos de linhagem e estágio de maturação presentes na superfície e no citoplasma do linfoblastos (PINHEIRO, 2012).

A LLA precursora de células B constitui aproximadamente 75% dos casos de LLA infantil. Na LLA-B os principais marcadores para diagnóstico e subclassificação são antígenos específicos dos linfócitos B, dos quais se destacam o PAX5 (proteína ativadora específica de célula B), CD19, CD20, CD22 (citoplasmáticos e de membrana) e CD24 e CD79a (citoplasmáticos) (ONCIU, 2009; CHIARETTI, *et al.* 2014; TERWILLIGER, 2017).

Quatro subtipos de LLA-B são descritos por apresentarem um conjunto específico de antígenos. Os marcadores mais comuns são CD19, CD22 e CD79a nos quais, por convenção, a reação positiva para pelo menos dois desses marcadores é suficiente para caracterizar o subtipo EGIL B-I da LLA-B. O antígeno CD10 é considerado comum na LLA, sendo expresso de maneira constante em progenitores de células B normais e na LLA-B, caracterizando o subtipo EGIL B-II. Nos casos onde há identificação adicional de cadeia citoplasmática pesada é caracterizado o grupo pré-B (subtipo EGIL B-III), enquanto que a presença de cadeias leves de imunoglobulina de superfície define a LLA-B madura (subtipo EGIL B-IV) (ONCIU, 2009; CHIARETTI, *et al.* 2014).

A LLA-T é frequente em aproximadamente 25% dos casos de LLA. Os marcadores imunofenotípicos mais comuns das células T são CD1a, CD2, CD3 (membrana e citoplasma), CD4, CD5, CD7 e CD8. Os antígenos CD2, CD5 e CD7 são marcadores das células T mais imaturas, mas nenhum deles é absolutamente específico para as linhagens celulares, de forma que o diagnóstico inequívoco de LLA-T se baseia na demonstração de CD3 citoplasmático / de superfície (CHIARETTI, *et al.* 2014).

Em LLA-T a expressão de CD10 é bastante comum (25%) e não específica; CD34 e os antígenos mielóides CD13 e/ou CD33 também podem ser expressos. Os subconjuntos conhecidos de LLA-T são: EGIL T-I pró-T (cCD3 +, CD7 +), EGIL T-II pré-T (cCD3 +, CD7 + e CD5 / CD2 +), EGIL cortical T-III (cCD3 +, CD1a +, sCD3 + / -) e EGIL T-IV maduro (cCD3 +, sCD3 +, CD1a-). Finalmente, um novo subgrupo que foi recentemente caracterizado é representado pelo chamado LLA-ETP (Early-T Precursor), que apresenta características imunofenotípicas características, que são, ausência de expressão de CD1a e CD8, fraca expressão de CD5 e expressão de pelo menos um marcador mielóide e/ou marcador de células estaminais (COUSTAN-SMITH, *et al.* 2009; CHIARETTI, *et al.* 2014).

1.1.4. Genética da LLA

Em 2016, foi publicada a quarta edição da classificação da OMS para as neoplasias linfóides, mielóides e leucemias agudas. As principais atualizações

refletem um consenso entre hematopatologistas, geneticistas e clínicos da área e baseiam-se na incorporação de novas informações hematológicas, morfológicas, citogenéticas e genéticas moleculares na caracterização imunológica e imunofenotípica que produzem novas perspectivas em relação aos marcadores diagnósticos e prognósticos que fornecem novos *insights* para a compreensão da patobiologia da doença (ARBER, 2016; SWERDLOW, 2016; LEONARD, 2017).

1.1.4.1. Caracterização genética da LLA tipo B (LLA-B) infantil

Cerca de três quartos dos casos de LLA-B apresentem alterações cromossômicas detectáveis por abordagens citogenéticas tradicionais. Das alterações descritas para LLA-B, destacam-se: alta hiperdiploidia, com ganho de pelo menos 5 cromossomos ou hipodiploidia, abaixo de 44 cromossomos. As translocações mais comuns são t(12; 21) (p13; q22) codificando *ETV6-RUNX1* (*TEL-AML1*), t(1; 19) (q23; p13.3) codificando *TCF3-PBX1* (*E2A-PBX1*), t(9; 22) (q34; q11.2) que codifica BCR-ABL e t(v;11; q23.3) gerando rearranjo KMT2A. É importante destacar que outras translocações, embora menos comuns, também fazem parte do espectro da LLA-B e são mostradas na tabela 2 (MULLIGHAN, 2013; ARBER, 2016; PUI, 2006; FADERL *et al.* 2003).

Ademais, de acordo com a quarta edição da classificação da OMS para leucemias agudas, duas novas categorias provisórias com anormalidades genéticas recorrentes foram incorporadas na classificação da LLA-B: 1) Leucemia linfoblástica aguda de células B com translocações envolvendo receptores de tirosina-quinases ou receptores de citocinas (leucemiae linfoblástica aguda semelhante à *BCR-ABL1*) (DEN BOER, 2009; MULLIGHAN, 2009). 2) Leucemia linfoblástica aguda de células B com amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (*IAMP21*) (HEEREMA, 2013). Ademais, a classificação da hipodiploide LLA-B agora destaca a associação única entre mutações hipodiploides e *TP53* (ARBER, 2016).

Além disso, estudos de sequenciamento *Sanger* identificaram Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em alguns genes, os quais apresentam influência no desenvolvimento da LLA-B (SNPs no gene *PAX5* e menos comumente, *IKZF1*), sinalização Ras (*NRAS*, *KRAS* e *NF1*), sinalização

de receptores de citocinas (*IL7R*, *JAK2*) e supressão tumoral (*TP53*) (MULLIGHAN, 2013; ZHANG, 2011).

1.1.4.2. Caracterização genética da LLA tipo T (LLA-T) infantil

A LLA-T é descrita na literatura como o subtipo que apresenta o pior prognóstico terapêutico quando comparado a LLA-B (AIFANTIS *et al.*, 2008; Vlierberghe e Ferrando, 2012). Dentre as principais alterações genéticas e citogenéticas, destacam-se: o rearranjo de locus do gene receptor das células T, para genes de fatores de transcrição incluindo *TLX1* (*HOX11*), *TLX3* (*HOX11L2*), *LYL1*, *TAL1* e *MLL* (HARRISON, 2002; AIFANTIS, 2008).

Similar à LLA-B, algumas mutações genéticas como SNPs são frequentes na LLA-T e alteram a frequência com que determinados genes são expressos. Entre esses genes estão *NOTCH1*, *CDKN1/2*, deleção / mutação de *PTEN*, *WT1*, *FBXW7* e amplificação de *MYB*. É importante ressaltar que vários genes estão envolvidos em diferentes tipos de alterações genéticas, incluindo alterações no número de cópias, translocação e mutação de sequência (por exemplo, *PAX5*, *WT1* e *PTEN*) (WENG, 2004; O'NEIL, 2007; GUTIERREZ, 2009; TOSELLO, 2009; MULLIGHAN, 2013). A frequência das principais alterações genéticas presentes na LLA infantil é mostrada na figura 3.

Figura 3. Frequências estimadas de todos os subtipos genéticos específicos da infância (Fonte: PUI, et al. 2019).

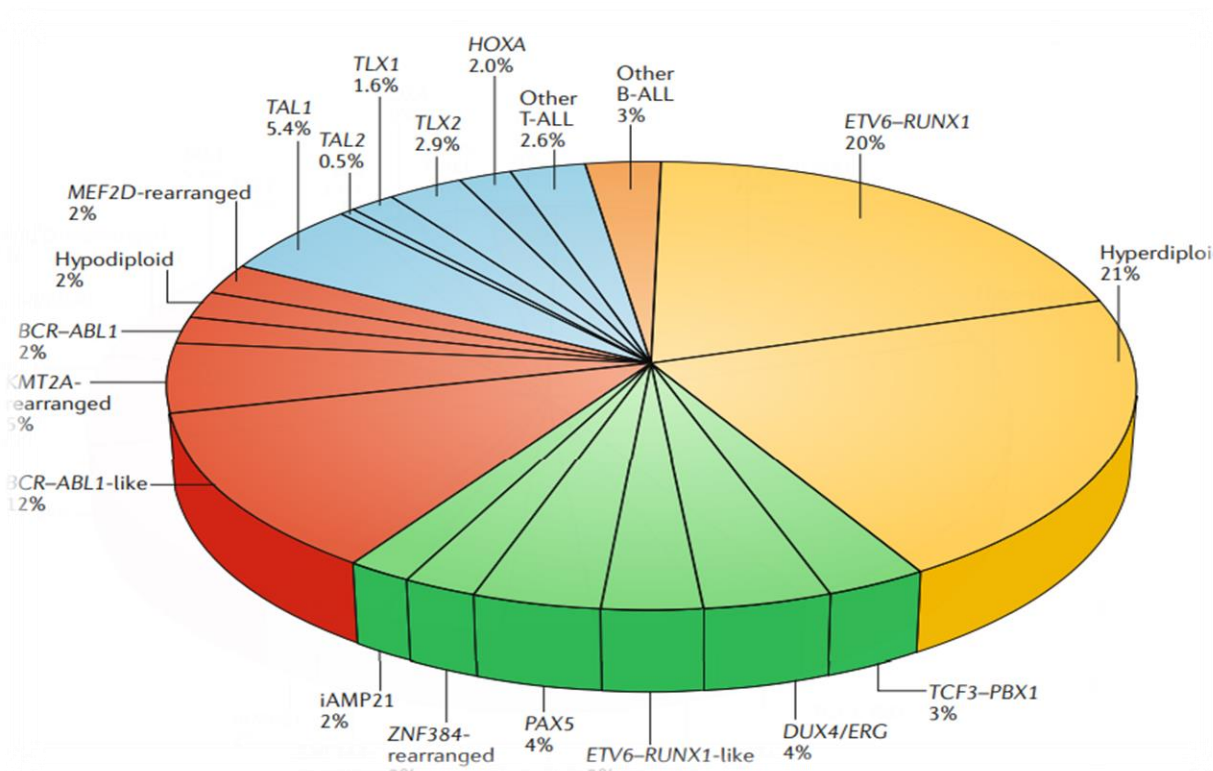


Figura 3. O gráfico de pizza mostra a estimativa das frequências de cada subtipo de leucemia linfoblástica aguda (LLA) entre pacientes tratados Estudo de Terapia Total St. Jude XV. Os subtipos presentes em LLA de células T (LLA-T) são representados em azul. Entre o subgrupo precursor de células B (LLA-B), os subtipos de baixo risco estão em amarelo, de risco intermediário estão em verde e os de alto risco estão em vermelho; no entanto, o prognóstico dos subtipos genéticos depende da eficácia do tratamento e, portanto, podem diferir entre vários ensaios clínicos. Além disso, o prognóstico dos 3% dos pacientes com LLA-B não pode ser classificado em um desses subgrupos (segmento laranja) e, portanto, não pode ser previsto no momento.

A tabela 2 mostra as categorias definidas pela OMS para a leucemia linfoblástica dos tipos B e T, de acordo com a inclusão de novos dados citogenéticos e genéticos presentes na literatura para classificação da LLA infantil.

Tabela 2. Categorias da Leucemia Linfoblástica dos tipos B e T de acordo com a OMS (Fonte: ARBER, 2016).

Leucemia/linfoma linfoblástico de células B
Leucemia/linfoma linfoblástico B, NOS
Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23.3); rearranjo <i>KMT2A</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31.1;q32.3) <i>IL3-IGH</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
<i>Entidade provisória: leucemia/linfoma linfoblástico B, como BCR-ABL1</i>
<i>Entidade provisória: leucemia/linfoma linfoblástico B com iAMP21</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico de células T
<i>Entidade provisória: leucemia linfoblástica precursora de célula-T precoce</i>
<i>Entidade provisória: leucemia/linfoma linfoblástica de células Natural Killer (NK)</i>

1.1.5. Susceptibilidade à LLA

A alta incidência de LLA infantil em diversos países levou a uma ampla investigação dos fatores ambientais e genéticos relacionados à sua predisposição. Entre os fatores ambientais, destacam-se: a exposição infantil e pós-natal à pesticidas internos que aumentam em até 50% o risco de desenvolvimento da leucemia infantil. A exposição materna aos pesticidas durante a gravidez também foi relacionada com um maior risco de LLA, enquanto a exposição paterna antes da concepção aumentou o risco de LLA em 30% (SCHUZ J e ERDMANN F, 2016; CHEN, *et al.* 2015; VAN, *et al.* 2011). Outro fator ambiental extensivamente investigado é a radiação ionizante, que é considerada uma causa estabelecida de leucemia infantil. Contudo, o desenvolvimento da leucemia associada à radiação é observado principalmente após a aplicação de doses terapêuticas, onde o maior ônus é leucemia secundária após tratamento de uma neoplasia primária (IARC, 2016; SCHMIEGELOW, *et al.* 2013).

Além da contribuição de risco de fatores ambientais para o desenvolvimento da LLA, a contribuição genética corresponde a grande maioria dos fatores investigados relacionados ao risco de leucemia infantil. Algumas

síndromes genéticas, como a Síndrome de Down e síndrome de Li-fraumeni, são associadas uma maior predisposição à LLA (SCHUZ e ERDMANN F, 2016). A síndrome de down (trissomia do cromossomo 21) é a mais documentada e apresenta uma relação clara com a LLA. Crianças com essa síndrome têm um risco de desenvolvimento LLA aumentado em até 20 vezes e a maioria dos casos mostraram um fenótipo precursor de células B (CARROL e RAETZ, 2012; SCHUZ e ERDMANN F, 2016). Além disso, pacientes com síndrome de down apresentam um alto risco de recidiva e mortalidade relacionada à terapia para LLA (IZRAELI, *et al.* 2014). Outra anormalidade cromossômica extensivamente investigada na LLA, embora rara, é a translocação Robertsoniana Rob(15; 21) (q10; q10)c, que apresenta um risco aumentado de 2700 vezes para o desenvolvimento de um subtipo específico de LLA caracterizado por uma amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21) (LI, *et al.* 2014; HARRISON, 2015).

Estudos de genoma amplo, incluindo *microarray* e NGS, revelaram diversos componentes envolvidos em múltiplas vias celulares que são frequentemente mutados na LLA. Desses componentes destacam-se genes envolvidos no desenvolvimento linfóide (*PAX5*, *IKZF1* e *EBF1*), supressão tumoral (*CDKN2A* / *CDKN2B*, *PTEN* e *RB1*), sinalização de receptores de citocinas (*CRLF2*, *IL7R* e *FLT3*), sinalização RAS (*NRAS*, *KRAS* e *PTPN11*), regulação transcricional (*ETV6*, *ERG*, *TBL1XR1* e *CREBBP*) e modificação epigenética (*CREBBP*, *EP300*, *SETD2* e *NSD2*) (ROBERTS e MULLIGHAN, *et al.* 2015).

Entre todas as variações genéticas que podem ocorrer no genoma, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é a mais comum. Dependendo do local e gene em que ocorrem, os SNPs podem interferir na função gênica e afetar vias metabólicas (BRISSON, *et al.* 2015). Vias envolvidas no sistema de xenobióticos, sistema de reparo do DNA e de regulação celular são frequentemente estudadas e vários SNPs nessas vias foram identificados como fatores de risco para o desenvolvimento de LLA.

1.1.6. Estudos genômicos em miscigenados e as diferenças étnicas na LLA

O Brasil é um país com alta mistura étnica, sendo um dos países mais miscigenados do mundo, principalmente por ter sido formada a partir de um processo gradual de miscigenação que envolveu o colonizador europeu, o nativo americano e os africanos, trazidos compulsoriamente para o país. Como o processo de colonização foi muito diferente em regiões geopolíticas distintas do país, a contribuição de cada grupo étnico ancestral varia substancialmente entre as regiões geográficas: no Nordeste brasileiro é elevada a contribuição de africanos; no sul e no sudeste do país a contribuição de europeus é a maior de todas as regiões; e as populações do Norte do Brasil têm a maior contribuição de ameríndios em relação às populações de todas as outras regiões geográficas (SANTOS, *et al.* 2010).

Alguns estudos apontam que a distribuição de SNPs é variável em populações etnicamente diferentes (WALSH, *et al.* 2013). Essas variações polimórficas culminam em frequências genotípicas características de determinadas populações e podem influenciar na ocorrência de diversas doenças, incluindo a LLA. Ademais, a influência da ancestralidade genética se estende não apenas a investigação de risco de doenças, mas também a estudos farmacogenéticos (CHOW, *et al.* 2010; CARVALHO, *et al.* 2015; CARVALHO, *et al.* 2018).

É bem descrito na literatura que diferenças étnicas podem influenciar no desenvolvimento e tratamento da LLA. Sabe-se, por exemplo, que crianças altamente miscigenadas, como as hispânicas, tendem a apresentar um maior risco de desenvolvimento da LLA-B quando comparadas com outros grupos étnicos. Um dos principais fatores de risco associado a alta incidência de LLA em hispânicos está a alta proporção de ascendência ameríndia, na qual a cada acréscimo de 20% dessa ancestralidade no genoma representa um aumento de 1,2 vezes de desenvolver a LLA-B (WALSH, *et al.* 2013; XU, *et al.* 2013).

Adicionalmente, um trabalho desenvolvido em uma população altamente miscigenada do Norte do Brasil, identificou uma alta associação entre a ancestralidade ameríndia e maior risco de desenvolver LLA, onde a cada incremento de 10% da ancestralidade ameríndia representa um aumento de 40%

no risco de LLA (CARVALHO, *et al.* 2015). Além disso, um estudo farmacogenético também foi realizado na mesma população miscigenada, na qual 50% dos pacientes sofreram pelo menos um episódio de toxicidade grave (grau 3 a 4) dos tipos gastrointestinal ou neurológica durante a fase de consolidação/manutenção do tratamento (CARVALHO, *et al.* 2018). Logo, investigações farmacogenéticas em diferentes grupos humanos ajudam a identificar populações que podem se beneficiar mais de um fármaco, ou identificar efeitos adversos que não são vistos em outras populações (SUAREZ-KURTZ, *et al.* 2014). Ademais, sabendo que a distribuição de SNPs é variável em populações etnicamente diferentes (WALSH, *et al.* 2013) e que essas variações podem influenciar na susceptibilidade, no desenvolvimento de toxicidades e na forma como diferentes populações respondem ao tratamento, é importante que haja uma caracterização ancestral adequada da população investigada (CARVALHO, *et al.* 2015; SUAREZ-KURTZ, *et al.* 2014).

É importante ressaltar que o princípio que comanda as análises de estratificação populacional diz que: em uma população onde as proporções de mistura étnica variam entre seus indivíduos; e na qual as frequências alélicas de um determinado marcador variam entre suas subpopulações ancestrais, poderá haver relações entre alelos de loci não ligados (ou seja, alelos não ligados tendem a ser herdados em conjunto, muito mais em função de sua ancestralidade). Este é o princípio o qual se convencionou chamar de associação decorrente de subestruturação desenvolvida por Pritchard (PRITCHARD e DONNELLY, 2001). Uma das estratégias para evitar essa influência da estratificação populacional em estudos de comparação entre dois grupos, é genotipar um conjunto de marcadores informativos de ancestralidade (*IAM – Ancestry Informative Markers*) para assim estimar a mistura individual de cada amostra, e com isso, utilizar os dados para inferir a contribuição de cada subpopulação ancestral. Quando assim empregados, essas proporções podem ajustar até mesmo pequenos efeitos da ancestralidade sobre os resultados (SANTOS, *et al.* 2010).

Diversos estudos já utilizaram a análise de ancestralidade genética baseada em 61 IAMs descritos por Santos (2010) *et al.* e Ramos (2016) *et al.*, onde foram estimadas as proporções de indivíduos europeus, africanos e de ancestralidade ameríndia, as quais foram devidamente controladas nas análises

estatísticas afim de evitar inferências errôneas. (SANTOS, *et al.* 2010; RAMOS, *et al.* 2016; CARVALHO, *et al.* 2018; FERNANDES, *et al.* 2013; SILVA, *et al.* 2017).

Em suma, o controle genômico de ancestralidade é uma ferramenta de suma importância que nos permite evitar conclusões errôneas a respeito de marcadores genéticos associados ao desenvolvimento do câncer, bem como de efeitos adversos ao tratamento, principalmente em populações altamente miscigenadas como da Região Norte do Brasil.

1.2. MicroRNAs

1.2.1. Biogênese e Função dos MicroRNAs

MicroRNAs (ou miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes que apresentam entre 18 a 24 nucleotídeos. Eles atuam como reguladores de diversas vias biológicas, incluindo vias relacionadas a progressão de doenças genéticas, como o câncer (CALDAS e BRENTON, 2005; CALIN e CROCE, 2006; CEPPI e PETER, 2014).

A biossíntese dos microRNAs começa no núcleo com RNA polimerase II realizando a transcrição gênica, que gera moléculas de microRNA primárias (pri-miRNA). Esses pri-miRNAs são processados posteriormente pela ribonuclease DROSHA e DGCR8, que forma precursor de microRNA (pré-miRNA). Moléculas pré-miRNA são então transportadas do núcleo para o citoplasma através das proteínas Exportina-5 e RAN. As proteínas DICER, TRBP ou PACT e Argonauta (AGO1–4) regulam o processamento do pré-miRNA e a montagem do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) com duplex de miRNA. Em RISC, uma das cadeias de miRNA (cadeia passageira) é liberada, enquanto a segunda cadeia (cadeia guia) pode atuar como reguladora da expressão gênica. (KIM, 2005; HA e KIM, 2014; KROL, *et al.* 2010; He J, *et al.* 2016; DROBNA, *et al.* 2018). A biogênese dos microRNAs é demonstrada na figura 4.

Figura 4. Biogênese dos microRNAs (Fonte: adaptada de: HE J, *et al.* 2015).

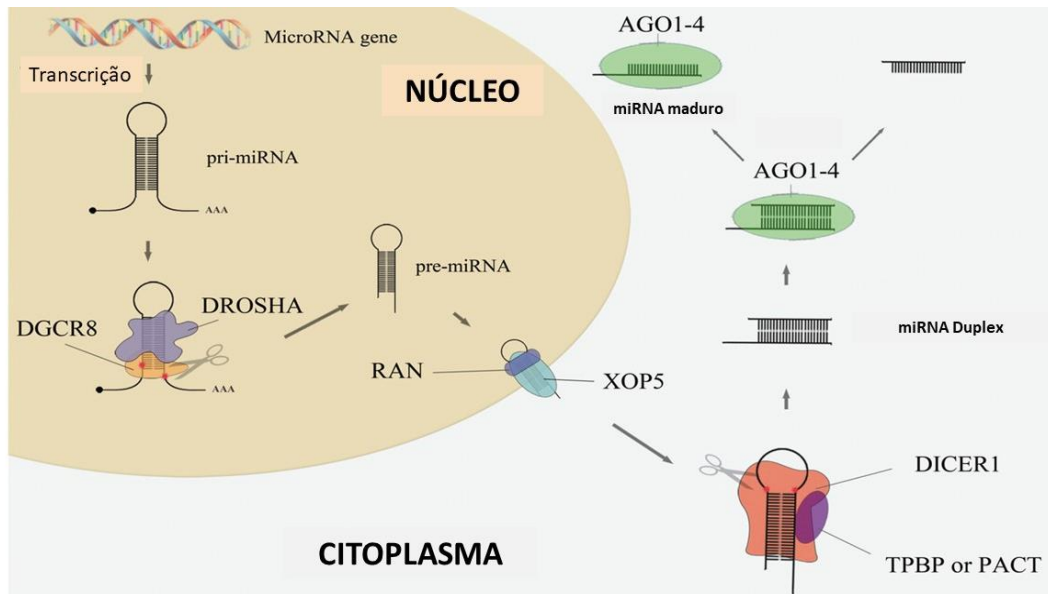


Figura 4. Biogênese dos microRNAs. A biogênese dos microRNAs tem início no núcleo, a partir da sua transcrição modificação inicial em pri-miRNA, seguida de modificações causadas por DROSHA e DGCR8 que formam o pré-miRNA. Este pré-miRNA será transportado para o citoplasma através da proteína exportina 5 (XPO5). No citoplasma, o pré-miRNA sofrerá outras modificações por DICER e AGO1, até a formação do miRNA maduro, que poderá ser conduzido, via complexo RISC, até seu alvo.

Os microRNAs atuam na regulação pós-transcricional da expressão gênica por meio da repressão direcionada da tradução do RNA mensageiro (mRNA) ou pela degradação do mRNA via complexo RISC (Figura 5). Essas moléculas exercem sua função reguladora negativa ligando-se a elementos de resposta ao microRNA (MRE) localizados principalmente em regiões 3'UTR de seus mRNAs alvo. A ligação do microRNA ao MRE ocorre através de uma sequência complementar de 6-8 nucleotídeos de comprimento (sequência *seed*), geralmente incorporando de 2-7 nucleotídeos da extremidade 5' do microRNA (BARTEL, 2009; ELLWANGER, *et al.* 2011).

Figura 5. Mecanismo funcional dos microRNAs.

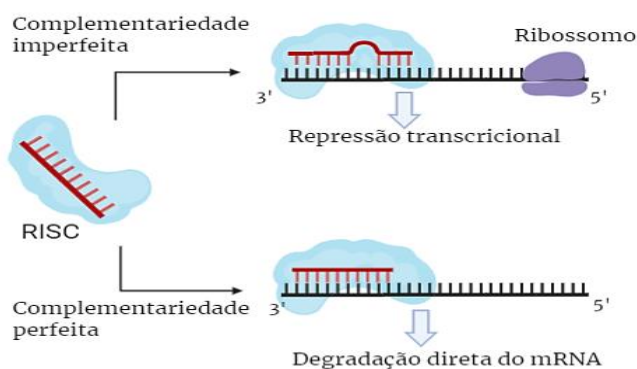


Figura 5. Mecanismo funcional dos microRNAs. 1) Através da complementariedade perfeita entre a região *seed* do microRNA e seu alvo, levando a repressão transcricional. 2) Através da complementariedade completa entre a região *seed* do microRNA e seu alvo, levando a degradação imediata do mRNA.

Em animais (incluindo seres humanos) a interação microRNA-mRNA não requer uma complementaridade de sequência completa. Os microRNAs estão envolvidos em redes regulatórias complexas de expressão gênica onde um único RNAm tipicamente contém múltiplas MREs, podendo ser regulado por muitos microRNAs diferentes. Além disso, um único microRNA também pode ter como alvo dezenas a centenas de mRNAs diferentes (GRIMSON, *et al.* 2007; WITKOS, *et al.* 2011; DROBNA, *et al.* 2018).

1.2.2. Alterações em microRNAs e seu papel na oncogênese

Fisiologicamente, os perfis de expressão dos miRNAs são específicos do tecido e dependem do estágio de desenvolvimento do organismo (Bartel, 2009). Padrões anormais de expressão de miRNAs foram mostrados em vários tipos de células tumorais, incluindo neoplasias hematológicas (GARZON, *et al.* 2008; WALLAERT, *et al.* 2017; DROBNA, *et al.* 2018). Dependendo dos seus alvos, os microRNAs podem agir como supressores tumorais ou oncogenes. Os microRNAs superexpressos de forma aberrante que silenciam a expressão de genes supressores de tumor, agem assim como oncogenes (conhecidos como oncomir), levando à tumorigênese. Adicionalmente, quando microRNAs que atuam como supressores tumorais (silenciando oncogenes) não estão expressos, pode-se iniciar um processo cancerígeno (Figura 6) (DROBNA, *et al.* 2018).

Figura 6. Mecanismo de ação supressora e oncogênica tumoral de miRNAs no contexto da biogênese de miRNA. (Fonte: adaptada de: DROBNA, *et al.* 2018).

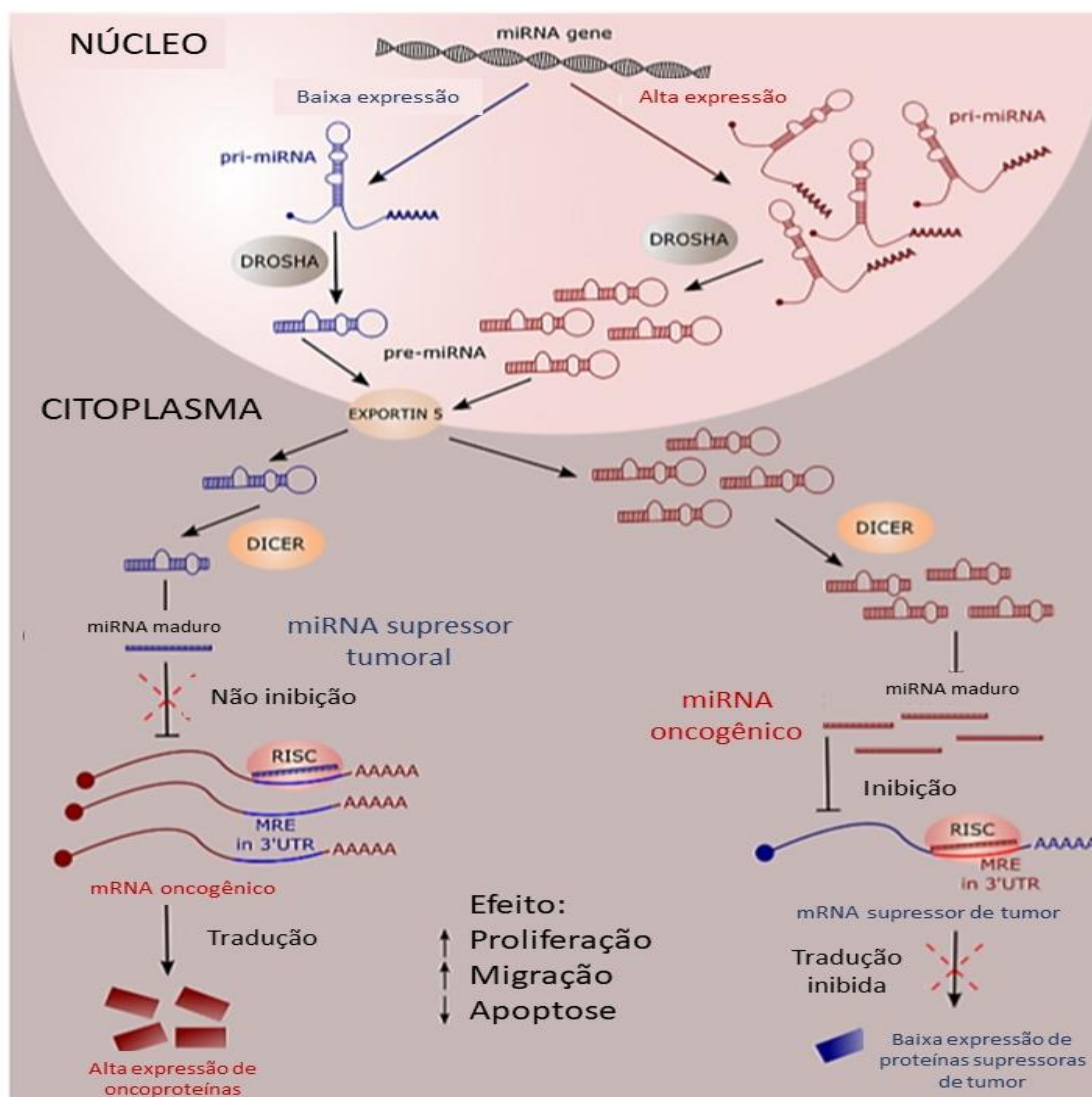


Figura 6. Mecanismo de ação supressora e oncogênica tumoral de miRNAs no contexto da biogênese de miRNA. No núcleo: Fatores que afetam a transcrição dos microRNAs podem atuar e modular a expressão de microRNAs levando a uma baixa ou alta expressão. No citoplasma: a baixa expressão de miRNA supressor tumoral leva a inibição ineficaz de mRNA oncogênico, aumentando a expressão de oncoproteínas. A superexpressão de miRNA oncogênico, leva a frequente inibição de mRNA supressor tumoral, diminuindo a expressão de proteínas supressoras. Os dois mecanismos contribuem para maior proliferação, maior migração e diminuição da apoptose.

O perfil de expressão de microRNAs foi investigado e comparado entre amostras de pacientes com LLA e amostras de indivíduos sem a doença. Foi observado que diversos microRNAs estão desregulados na LLA (OLIVEIRA, *et al.* 2011; 2012). Os resultados mais expressivos mostram que os microRNAs MIR-146a, MIR-34, MIR-128, MIR-142 e MIR-181 são hiper-regulados na LLA, enquanto MIR-100 e MIR-196 são hiporregulados (DROBNA, *et al.* 2018; OLIVEIRA, *et al.* 2011; 2012; 2018; SCHOTTE, *et al.* 2009; JU, *et al.* 2009; ZHANG, *et al.* 2009).

A expressão alterada de microRNAs pode levar à oncogênese, uma vez que esses microRNAs estejam envolvidos na regulação de vias metabólicas relacionadas ao controle do ciclo celular ou condições que influenciem na progressão tumoral. O MIR-499a, por exemplo, regula diversas vias de sinalização e foi previamente descrito com um importante papel sobre as condições de hipóxia em doenças como o câncer (WILSON, *et al.* 2010; YANG, *et al.* 2018). Foi observado ainda, que o MIR-499a funciona como um supressor tumoral, regulando negativamente a expressão do oncogene VAV3, em câncer de pulmão de não-pequenas células (LI, *et al.* 2016). Também foi demonstrado que a desregulação na expressão do MIR-499 apresenta significativa correlação com a susceptibilidade à LLA (MAVRAKIS, *et al.* 2011). Com relação aos genes presentes na maquinaria de síntese dos microRNAs, vários trabalhos observaram que a expressão aberrante de *DROSHA*, em nível de mRNA ou da sua proteína, pode influenciar na sobrevivência e na progressão de vários tipos de câncer, incluindo adenocarcinoma, câncer de esôfago, câncer cervical e câncer de ovário (MI, *et al.* 2007; SUGITO, *et al.* 2006; MURALIDHAR, *et al.* 2007; MERRITT, *et al.* 2008).

A biogênese aberrante dos microRNAs durante o câncer pode ocorrer devido alterações na transcrição dos seus genes. Essas alterações incluem modificação na regulação epigenética, como modificação de histonas; regulação da transcrição por meio de oncogenes e supressores tumorais; e alterações genéticas, como mutações pontuais e deleção de genes de microRNAs (LIN e GREGORY, 2015). A figura 7 resume os mecanismos que levam à expressão aberrante de microRNAs no câncer.

Figura 7. Fatores que afetam a transcrição dos genes de microRNAs.

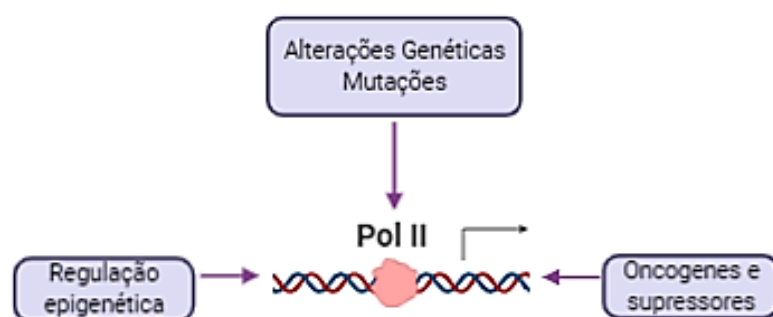


Figura 7. Fatores que afetam a transcrição dos genes de microRNA: Regulação epigenética; Alterações genéticas como mutações (SNP ou INDEL); e ação de Oncogenes e supressores tumorais

Alterações na expressão do microRNA e de proteínas envolvidas na sua síntese podem ocorrer devido variações genéticas, as quais têm sido frequentemente estudadas (RYAN *et al.*, 2010; DROBNA, *et al.* 2018). Os SNPs são a fonte mais comum de variação genética dentro do genoma humano e polimorfismos que causam mutações não sinônimas em regiões codificadoras de genes são conhecidos por causar sérios efeitos deletérios a jusante. No entanto, mesmo polimorfismos em regiões não-codificadoras podem gerar profundas consequências funcionais ao interromper processos regulatórios essenciais (YE, 2018).

Especificamente, os polimorfismos que alteram os microRNAs em seus sítios de ligação podem romper a regulação das vias biológicas importantes implicadas na tumorigênese e na progressão do tumor. Muitos desses polimorfismos associados a microRNAs (miR-SNPs) têm sido descritos como importantes biomarcadores de risco, prognóstico e resultados do tratamento do câncer, incluindo cânceres hematológicos, como a LLA (YE, 2018). Por exemplo, SNPs presentes nos genes *DROSHA*, *MIR196A* e *MIR34B*, entre outros, têm sido correlacionados com a modulação do risco de LLA em diversas populações (GUTIERREZ-CAMINO *et al.*, 2018; LOPEZ-LOPEZ, *et al.* 2014; TONG, *et al.* 2014; HASHEMI, *et al.* 2016).

Por fim, há um crescente aumento na investigação do papel de SNPs presentes em genes de microRNA e em genes responsáveis pela síntese desses microRNAs, afim de compreender como essas alterações influenciam no desenvolvimento de diversos cancers, inclusive a LLA.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a associação de 7 polimorfismos em genes de microRNAs e 3 em genes envolvidos na biogênese de microRNAs com a susceptibilidade à leucemia linfóide aguda tipo B em uma população miscigenada da Amazônia brasileira.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Genotipar 10 polimorfismos em genes de microRNA e de sua biogênese: rs636832 (*AGO1*), rs10035440 (*DROSHA*), rs3805500 (*DROSHA*), rs213210 e rs107822 (*MIR219-1*), rs2910164 (*MIR146A*), rs12894467 (*MIR300*), rs3746444 (*MIR499A*), rs4919510 (*MIR608*), rs2505901 (*PRÉ-MIR938*), em pacientes com LLA (Grupo caso) e indivíduos sem LLA (Grupo controle);
- II. Descrever e comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos nos genes de microRNA e da biogênese dos microRNAs nos grupos caso e controle em uma população miscigenada da Amazonia brasileira.
- III. Genotipar 61 marcadores autossômicos informativos de ancestralidade para identificar as proporções individuais de ancestralidade genética de europeu, africano e ameríndio em pacientes do grupo caso e indivíduos do grupo controle, a fim de realizar o controle genômico de ancestralidade e comparar suas proporções entre os grupos caso e controle;

3. CAPITULO I - ARTIGO SUBMETIDO AO JORNAL: LEUKEMIA RESEARCH

PAPEL DE POLIMORFISMOS PRESENTES EM *DROSHA*, *MIR499A* E *PRÉ-MIR938* SOBRE O RISCO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EM POPULAÇÃO MISCIGENADA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

Tatiane Piedade de Souza¹, Darlen Cardoso de Carvalho¹, Alayde Viera Wanderley^{1,4}, Amanda de Nazaré Cohen Lima de Castro¹, Juliana Carla Gomes Rodrigues¹, Marianne Rodrigues Fernandes¹, Lucas Favacho Pastana¹, Lui Wallacy Morikawa Souza Vinagre¹, Artur Luiz da Costa Silva³, Paulo Pimentel de Assumpção¹, Sidney Santos^{1,2}, André Salim Khayat¹, Ney Pereira Carneiro dos Santos^{1,2}.

1 Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, PA, Brasil.

2 Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, Pará, PA, Brasil.

3 Laboratório de Engenharia Biológica dp PTC - Guamá, Belém, Pará, PA, Brasil.

4 Hospital Oncológico Infantil Otávio Lobo – HOIOL – Belém, Pará, PA, Brasil.

*Correspondência: Ney Pereira Carneiro dos Santos

Email: npcsantos.ufpa@gmail.com

Hospital Universitário João de Barros Barreto - Núcleo de Pesquisa em Oncologia, 2º piso da Unidade de Alta Complexidade em Oncologia. Av. Mundurucus, 4487, Guamá, 66073-005, Belém –PA. Tel: +55 (91) 3201-6778

RESUMO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo de câncer que mais acomete crianças no mundo. A etiologia da LLA inclui o envolvimento de fatores genéticos, como mutações em genes regulatórios. Neste contexto, polimorfismos que alteram a função normal de microRNAs relacionados a etiologia da LLA, vêm sendo amplamente investigados. No entanto, dados sobre esses polimorfismos em populações miscigenadas são escassos na literatura. Nós investigamos o papel de 10 polimorfismos em genes de microRNAs e genes envolvidos na maquinaria de síntese dos microRNAs na susceptibilidade à LLA infantil. A mostra foi composta por 100 pacientes com LLA e 180 indivíduos saudáveis. As análises estatísticas foram realizadas empregando programa estatístico SPSS v.25.0. Pacientes que exibiram o genótipo homozigoto mutante (AA) da variante rs3805500 no gene *DROSHA*, apresentaram um risco de quase 3 vezes maior de desenvolver LLA quando comparados aos outros genótipos ($p = 0,004$, OR= 2,913, IC= 1,415 - 5,998). Em relação aos polimorfismos em genes de microRNAs, para a variante rs3746444 presente no gene *MIR499A*, o genótipo homozigoto mutante foi associado a um risco de LLA aumentado em aproximadamente 17 vezes ($P < 0,001$, OR= 17,797, IC= 5,55 – 57,016). Ademais, foi observado um efeito protetor ao desenvolvimento de LLA associado ao genótipo homozigoto selvagem do polimorfismo rs2505901 do gene *MIR938*. Nossos resultados evidenciam que os polimorfismos genéticos presentes em moléculas regulatórias, como os microRNAs e genes envolvidos na sua síntese, são importantes na regulação do risco de desenvolver LLA na população estudada. Esperamos que os resultados encontrados no presente trabalho ajudem na compreensão mais ampla da etiologia da LLA.

Palavras chave: Leucemia Linfoblástica Aguda; microRNAs; Polimorfismo de nucleotídeo único; Susceptibilidade.

PAPEL DE POLIMORFISMOS PRESENTES EM *DROSHA*, *MIR499A* E *PRÉ-MIR938* SOBRE O RISCO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EM POPULAÇÃO MISCIGENADA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo de câncer mais frequente em crianças e adolescentes entre 0 e 19 anos em todo mundo, representando 28% de todas as neoplasias malignas nessa faixa-etária e 75% de todos os casos de leucemia [1,2,3]. Acredita-se que a etiologia da LLA é multifatorial, com o envolvimento de fatores ambientais e genéticos, os quais vêm sendo amplamente investigados. Entre esses fatores estão a exposição a agentes carcinogênicos, alterações cromossômicas e moleculares [4,5]. Muitos SNPs em genes participantes de vias regulatórias já foram descritos como papel importante no surgimento da LLA [6].

A investigação de SNPs presentes em genes de microRNAs tem emergido como uma nova linha de pesquisa genômica. A principal função dessas moléculas é regular a expressão gênica através do silenciamento pós-transcricional, se ligando por pareamento de bases e clivando RNAs mensageiros (mRNA) ou inibindo o início da tradução [7,8]. A presença de SNPs em genes de microRNAs ou em genes de proteínas envolvidas na síntese dos microRNAs pode afetar o funcionamento dos mesmos, alterando a regulação gênica. No entanto, ainda são poucos trabalhos que buscam analisar o efeito de SNPs presentes em regiões genômicas não codificadoras, que têm potencial regulatório importante. Além disso, dados sobre esses polimorfismos em populações miscigenadas, como a população da Amazônia brasileira, são inexistentes na literatura.

Em suma, o objetivo desse estudo foi investigar o papel de 10 polimorfismos em genes de microRNAs e genes envolvidos na maquinaria de síntese dos microRNAs, sobre a susceptibilidade à LLA em uma população miscigenada da Amazônia brasileira. Todos os polimorfismos selecionados foram previamente associados com o risco de diversos tipos de câncer, de acordo com os dados presentes na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Pacientes e controles**

O estudo incluiu 100 pacientes para o grupo caso diagnosticados com LLA-B através de imunofenotipagem e/ou diagnóstico molecular, todos atendidos no Hospital Otávio Lobo, centro de referência no tratamento do câncer pediátrico na Região Norte do Brasil. Os pacientes incluídos tinham entre 1 e 18 anos e excluídos pacientes recidivos e com comorbidades. Para o grupo controle, foram incluídos 180 indivíduos sem diagnóstico de LLA ou outro tipo de câncer e não aparentados entre si, com idade acima da faixa pediátrica que não desenvolveram LLA na infância.

- **Extração e quantificação:**

O DNA foi extraído a partir de sangue periférico utilizando o kit comercial de extração de DNA (Biopur Mini Spin Plus – 250 extraction kit (Biopur, Brazil)) e quantificadas com o NanoDrop 1000 spectrophotometer (Termo Scientific NanoDrop 1000; NanoDrop Technologies Wilmington, DE).

- **Controle genômico de ancestralidade:**

A análise de ancestralidade genética foi feita de acordo o descrito por Santos et al.,2010 e Ramos et al., 2016, utilizando um painel de 61 Marcadores Autossômicos Informativos de Ancestralidade (AIMs). As proporções individuais e globais de ancestralidade genética Europeia, Ameríndia e Africana foram feitas pelo software STRUCTURE v.2.3.4. [9,10,11].

- **Seleção dos marcadores:**

Todos os polimorfismos investigados (do tipo SNP) foram selecionados por apresentarem associação prévia com o risco a diversos tipos de câncer, de acordo com a literatura. Foram selecionados 10 polimorfismos (7 em genes de microRNAs e 3 em genes envolvidos na síntese dos microRNAs). A análise prévia à comparação entre os dois grupos consistiu em um controle de qualidade das amostras genotipadas, o qual incluiu polimorfismos com: I) $MAF \geq 1\%$; II) Genotipagem superior a 80%; III) Hardy-Weinberg (EHW). A significância do teste para o EHW foi ajustada para comparações múltiplas pela correção de Bonferroni. Após o controle de qualidade, os 10 polimorfismos foram incluídos para análise

de associação com o risco de LLA: rs636832 (*AGO1*), rs10035440 e rs3805500 (*DROSHA*), rs213210 e rs107822 (*MIR219-1*), rs2910164 (*MIR146a*), rs12894467 (*MIR300*), rs3746444 (*MIR499a*), rs4919510 (*MIR608*), rs2505901 (*pré-MIR938*). A Tabela suplementar S1 descreve os 10 polimorfismos investigados e o controle de qualidade.

- **Genotipagem:**

A genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foi realizada por discriminação alélica utilizando a tecnologia TaqMan OpenArray Genotyping, com um painel de 32 ensaios customizados, no equipamento QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, EUA) de acordo com o protocolo recomendado por Applied Biosystem. O software Taqman Genotyper foi utilizado para a análise dos dados das placas e precisão de leitura dos genótipos, além do controle de qualidade da genotipagem.

- **Análises estatísticas:**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS v.25.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Primeiro foi verificado se cada polimorfismo estava dentro do equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) no programa STRUCTURE v2.3.3. As comparações entre os grupos para as variáveis categóricas foram testadas em pares pelo teste do qui-quadrado, enquanto o teste t de Student foi utilizado para a análise de variáveis quantitativas. Análises multivariadas consideraram os fatores: gênero e ancestralidade genética ameríndia como fatores de confusão. Para a comparação da estimativa de ancestralidade genética entre as amostras, foi empregado o teste de Mann-Whitney. Todos os testes estatísticos consideraram probabilidade (p-valor) significativa quando $\leq 0,05$.

- **Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará (CAAE número 11433019.5.0000.5634).

RESULTADOS

Foi realizada a investigação de diferenças entre dados como idade, sexo e ancestralidade genética dos grupos (tabela 1). A média de idade foi estatisticamente diferente entre os grupos caso e controle ($p < 0,001$). Esse resultado era esperado uma vez que selecionamos intencionalmente um grupo controle a cima da faixa pediátrica por se encontrar fora do grupo de risco para LLA. Dessa maneira, não controlamos essa variável nas análises de associação com o risco. Também houve diferença significativa entre os grupos para a variável sexo, com uma predominância do sexo masculino no grupo caso ($p < 0,001$).

Com relação à ancestralidade genômica, as médias do componente ancestral dos dois grupos investigados está representada na tabela 1. Os resultados mostram que o grupo caso é composto etnicamente de 43% de ascendência europeia, 20% de contribuição africana e 36% de contribuição ameríndia, enquanto o grupo controle é formado por 45% de ascendência europeia, 24% de contribuição africana e 30% de contribuição ameríndia. A análise desses resultados mostra uma diferença significativa para a ancestralidade ameríndia, a qual foi predominante no grupo caso ($p = 0,004$). Tanto o sexo quanto a ancestralidade ameríndia foram controlados na análise de associação dos polimorfismos com o risco.

Tabela 1. Distribuição dos dados demográficos entre os grupos caso e controle.

Variáveis	Caso (100)	Controle (180)	p-valor
Sexo (M/F)	60/40	53/127	<0,001
Idade *	5,53 ± 3,991	65,97 ± 16,021	<0,001 ^a
<i>Ancestralidade Genética*</i>			
Europeu	0,429 ± 0,133	0,454 ± 0,170	0,189 ^b
Africano	0,203 ± 0,089	0,241 ± 0,138	0,213 ^b
Ameríndio	0,361 ± 0,154	0,304 ± 0,149	0,004 ^b

^a Significância determinado pelo teste t de Student.

^b Significância determinado pelo teste de Mann Whitney.

* Média (± DP = desvio padrão).

Foram investigados 3 SNPs em genes envolvidos na síntese dos microRNAs e foi observada uma diferença significativa para modelo recessivo (AA vs GG+GA) da variante rs3805500 do gene *DROSHA*. A presença do homozigoto mutante (AA) foi relacionada com o aumento de até 3 vezes no risco de desenvolvimento da LLA ($p = 0,004$, OR= 2,913, IC= 1,415 - 5,998).

A respeito dos polimorfismos em genes de microRNAs foram analisadas 7 variantes, das quais duas foram significativamente relacionadas com a susceptibilidade à LLA: *MIR499A* (rs3746444) e *PRÉ-MIR938* (rs2505901). A presença do homozigoto mutante (GG), referente ao polimorfismo investigado do gene *MIR499A*, foi associada a uma elevação do risco de LLA em até 17 vezes ($p < 0,001$, OR= 17,797, IC= 5,55 – 57,016). O genótipo homozigoto selvagem CC da variante rs2505901 presente no *PRÉ-MIR938* foi relacionado com um menor risco de LLA, conferindo um fator de proteção para a doença ($p = 0,013$, OR= 0,359, IC=0,160 – 0,805). As distribuições alélica e genotípica dos polimorfismos analisados estão representadas na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos investigados.

Genótipo_ID	Caso (%)	Controle (%)	p-valor	Modelo	OR (IC 95%)
<i>AGO1_rs636832</i>	75	150			
AA	8 (10,7)	14 (9,3)			
AG	34 (45,3)	67 (44,7)			AA + AG vs GG
GG	33 (44)	69 (46)	0,163	Recessivo	1,687 (0,809 – 3,520)
<i>Alélo A</i>	0,333	0,316			
<i>Alélo G</i>	0,666	0,683			
<i>DROSHA_rs10035440</i>	80	148			
TT	60 (75)	98 (66,2)			
TC	17 (21,3)	44 (29,7)			TT + TC vs CC
CC	3 (3,8)	6 (4,1)	0,434	Recessivo	2,082 (0,331 – 13,085)
<i>Alélo T</i>	0,856	0,810			
<i>Alélo C</i>	0,143	0,189			
<i>DROSHA_rs3805500</i>	74	159			
GG	11 (14,9)	50 (31,4)			
GA	26 (35,1)	51 (32,1)			GG+GA vs AA
AA	37 (50)	58 (36,5)	0,004	Recessivo	2,913 (1,415 - 5,998)
<i>Alélo G</i>	0,324	0,474			
<i>Alélo A</i>	0,675	0,525			

MIR219-1_rs213210	82	166			<i>AA vs AG + GG</i>
AA	64 (78)	134 (80,7)	0,813	Dominante	0,908 (0,409 – 2,015)
AG	16 (19,5)	19 (11,4)			
GG	2 (2,4)	13 (7,8)			
<i>Alelo A</i>	0,878	0,864			
<i>Alelo G</i>	0,121	0,135			
MIR219-1_rs107822	73	152			<i>CC vs CT + TT</i>
CC	36 (49,3)	85 (55,9)	0,831	Dominante	0,929 (0,471 – 1,832)
CT	30 (41,1)	53 (34,9)			
TT	7 (9,6)	14 (9,2)			
<i>Alelo C</i>	0,698	0,733			
<i>Alelo T</i>	0,301	0,266			
MIR146A_rs2910164	81	160			<i>GG vs GC + CC</i>
GG	47 (58)	68 (42,5)	0,091	Dominante	1,777 (0,912 – 3,462)
GC	24 (29,6)	74 (46,3)			
CC	10 (12,3)	18 (11,3)			
<i>Alelo G</i>	0,728	0,656			
<i>Alelo C</i>	0,271	0,343			
MIR300_rs12894467	76	175			<i>TT vs TC + CC</i>
TT	22 (28,9)	75 (42,9)	0,062	Dominante	0,513 (0,254 – 1,035)
TC	42 (55,3)	80 (45,7)			
CC	12 (15,8)	20 (11,4)			
<i>Alelo T</i>	0,565	0,657			
<i>Alelo C</i>	0,474	0,342			
MIR499_rs3746444	75	167			
AA	5 (6,7)	126 (75,4)			
AG	43 (57,3)	36 (21,6)			<i>AA+AG vs GG</i>
GG	27 (36)	5 (3,0)	< 0,001	Recessivo	17,797 (5,55 – 57,016)
<i>Alelo A</i>	0,353	0,862			
<i>Alelo G</i>	0,646	0,137			
MIR608_rs4919510	81	161			<i>GG vs GC + CC</i>
GG	5 (6,2)	18 (11,2)	0,325	Dominante	0,566 (0,182 – 1,760)
GC	29 (35,8)	58 (36)			
CC	47 (58)	85 (52,8)			
<i>Alelo G</i>	0,240	0,291			
<i>Alelo C</i>	0,759	0,708			
MIR938_rs2505901	76	150			<i>CC vs CT+TT</i>
CC	15 (19,7)	53 (35,3)	0,013	Dominante	
CT	38 (50)	46 (37,7)			0,359 (0,160 – 0,805)
TT	23 (30,3)	51 (34)			
<i>Alelo C</i>	0,447	0,506			

Alelo T	0,552	0,493
---------	-------	-------

OR: odds ratio; IC: Intervalo de confiança.

p-valor: regressão logística ajustada para sexo e ancestralidade genética ameríndia.

DISCUSSÃO

A população brasileira é uma das mais miscigenadas do mundo. Em nosso estudo encontramos uma miscigenação média de 42% europeia, 36% ameríndia e 20% africana, evidenciando um *background* genético muito diferenciado comparado com outras populações que investigaram SNPs em genes de microRNAs ou de sua maquinaria. Identificamos 3 SNPs associados com o risco de LLA, um localizado no gene *DROSHA* (rs3805500), envolvido na maquinaria de processamento de pri-miRNAs e pré-miRNAs; e dois presentes em genes de microRNAs: *MIR499* (rs3746444) e *PRÉ-MIR938* (rs2505901).

O gene *DROSHA* é um dos principais genes envolvidos na síntese dos microRNAs. Esse gene codifica uma Rnase tipo III, que é essencial para a maturação de pri-miRNAs e pré-miRNAs [12]. Em nossa análise observamos, para o gene *DROSHA*, que a presença do genótipo homozigoto mutante (AA) da variante rs3805500 eleva em até 3 vezes a susceptibilidade à LLA. Nenhum outro trabalho presente na literatura investigou o papel desse SNP sobre o risco de LLA, embora o mesmo tenha sido associado ao risco de outras leucemias [13,14]. Um estudo de GWAS identificou que a presença do alelo mutante (A) para a variante rs3805500 em haplótipo com outros dois polimorfismos, foi associada com um aumento do risco de LLC [13].

Os resultados encontrados por Martin-Guerrero e colaboradores (2015) ajudam a corroborar nossos achados, uma vez que o alelo mutante (A) contribui para o aumento do risco de leucemias [13]. Sugere-se que vias compartilhadas no desenvolvimento dessas leucemias podem ser influenciadas por polimorfismos em *DROSHA*. Além disso, o alelo mutante dessa variante encontra-se em desequilíbrio de ligação com a variante rs640831 no mesmo gene, que foi previamente relacionada com uma menor expressão do mRNA de *DROSHA*, alterando a maturação de pri-miRNAs e pré-miRNAs envolvidos na progressão de vários tipos de câncer [13,15,16,17,18,19].

Além de genes da maquinaria de síntese dos microRNAs, investigamos o SNP rs3746444 localizado na região *seed* de MIR-499a-3p e corresponde a uma troca de A > G, que pode comprometer a ligação do microRNA aos seus alvos [20,21]. Nossos resultados mostraram uma forte associação entre a presença do genótipo homozigoto mutante (GG) e o aumento, em até 17 vezes, do risco de desenvolvimento da LLA. São controversos os resultados para a presença do polimorfismo rs3746444 e sua associação a susceptibilidade a outros tipos de câncer [22,23]. O genótipo mutante (GG) da variante rs3746444 é relacionado com o risco de câncer gástrico e de pulmão em populações asiáticas, mas não em caucasianos [24,25]. A inconsistência desses resultados se deve em parte a diferentes backgrounds genéticos de diferentes tipos de câncer e a diferenças étnicas entre as populações estudadas [20]. Esses achados mostram a influência da etnicidade sobre investigações genéticas em populações etnicamente distintas, refletindo a importância do controle genômico de ancestralidade, como realizado em nosso trabalho.

O MIR938 é um importante microRNA envolvido nas vias regulatórias de genes relacionados com sobrevivência e apoptose celular [26]. Variantes do tipo SNP presentes no gene *MIR938* foram associadas com a alteração da sua biogênese e estabilidade [27,28]. Nós investigamos a variante rs2505901, que corresponde a uma mudança C>T região intrônica do gene *MIR938*. Foi observada uma diminuição de 33% no risco de LLA em pessoas com o genótipo selvagem dessa variante (CC). Vale ressaltar que poucos trabalhos investigaram o papel desse polimorfismo no desenvolvimento do câncer, e nenhum deles avaliou seu papel na LLA. Corroborando o efeito protetor da variante rs2505901, foi observada uma diminuição do risco de câncer gástrico, em indivíduos portadores do genótipo homozigoto selvagem (CC) [29].

Em suma, os resultados do nosso trabalho são únicos no cenário mundial, uma vez que nossa população de estudo é altamente miscigenada, com uma constituição genética diferenciada de populações etnicamente homogêneas que compõem outros estudos. Sugerimos que os SNPs rs3805500, rs3746444 e rs2505901 presentes, respectivamente, nos genes *DROSHA*, *MIR499* e *MIR938* estão relacionados com a susceptibilidade à LLA em nossa população. Por fim, do ponto de vista metodológico, a utilização de SNPs como biomarcadores é

vantajoso comparado à expressão de mRNA, uma vez que a genética germinativa pode ser facilmente investigada a partir do sangue periférico, com técnicas menos laboriosas e de menor custo.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* (2018), 68(6):394–424. doi:10.3322/caac.21492
2. Ward E, Desantis C, Robbins A, et al, Childhood and Adolescent Cancer Statistics, *Ca Cancer J Clin* (64) (2014), 83–103, doi: 10.3322/caac.21219.
3. Linet MS, Brown LM, Mbulaiteye SM, et al. International long-term trends and recent patterns in the incidence of leukemias and lymphomas among children and adolescents ages 0-19 years. *Int J Cancer.* (2016), 138(8):1862–1874. doi:10.1002/ijc.29924
4. Vijayakrishnan J, Studd J, Broderick P, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for B-cell childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Commun*, (2018), 9(1):1340. doi:10.1038/s41467-018-03178-z
5. International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC. (2016). Available at: <http://monographs.iarc.fr/>. Accessed October 10, 2016.
6. Brisson GD, Alves LR, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review. *Ecancermedicalscience*, (2015), (9)539, doi:10.3332/ecancer.2015.539
7. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol*, (2018), (9),402, doi:10.3389/fendo.2018.00402
8. Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Dawidowska M. T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers, *Blood Ver*, 32(6), (2018), 457–472, doi:10.1016/j.blre.2018.04.003
9. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, et al. Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48 – Insertion-Deletion. *Hum Mutat.* (2010), 31(2):184-90
10. Ramos BR de A, D'Elia MPB, Amador MAT, et al. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica* (2016), 1–7. doi: 10.1007/s10709-016-9894-1
11. Pritchard JK, Donnelly P. Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theor Popul Biol*, (60), (2001), 227–237.
12. Phua SL, Sivakamasundari V, Shao Y, et al. Nuclear accumulation of na uncapped RNA produced by Drosha cleavage of a transcript encoding miR-10b and HOXD4. *PLoSOne.* (6), (2011), e25689. doi:10.1371/journal.pone.0025689

13. Martin-Guerrero I, Gutierrez-Camino A, Lopez-Lopez E, et al. Genetic Variants in MiRNA Processing Genes and Pre MiRNAs Are Associated with the Risk of Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE*, (2015), 10(3):e0118905. doi:10.1371/journal.pone.0118905
14. Hashemi M, Hasani SS, Naderi M. DROSHA rs642321 Polymorphism Influence Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Preliminary Report. *Indian J Med Paediatr Oncol*, (38), (2017), 4:416–419. doi:10.4103/ijmpo.ijmpo_4_15
15. Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, et al. Pharmacogenetics of microRNAs and MicroRNAs Biogenesis Machinery in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS ONE* 9(3), (2014), e91261. doi:10.1371/journal.pone.0091261
16. Mi S, Lu J, Sun M, et al. MicroRNA expression. Signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2007). 104:19971–6. PMID:18056805
17. Sugito N, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res*. (2006), (12), 7322–8.
18. Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, et al. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J Pathol*. (2007) (212)368–77. PMID:17471471
19. Merritt WM, Lin YG, Han LY, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*. (2008), (359)2641–50. doi:10.1056/NEJMoa0803785
20. Hasani SS, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Naderi M, Omrani M, Sheybani-Nasab M. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a preliminary report. *Tumour Biol*. (2014), 35(1):219–225.
21. Gutierrez-camino A, Lopez-lopez E, Martin-guerrero I, Piñan MA, Garcia-miguel P. Noncoding RNA-related polymorphisms in pediatric acute lymphoblastic leukemia susceptibility. (2014), 1–7. doi:10.1038/pr.2014.43.
22. Zhang LH, Hao BB, Zhang CY, Dai XZ, Zhang F. Contributions of polymorphisms in miR146a, miR196a, and miR499 to the development of hepatocellular carcinoma. *Genet Mol Res*. (2016), (15)3: doi:10.4238/gmr.15038582
23. Nouri R, Ghorbian S. Association of single nucleotide polymorphism in hsa-miR-499 and hsa-miR-196a2 with the risk of prostate cancer. *Int Urol Nephrol*. (2019), 51(5):811–816. doi:10.1007/s11255-019-02099-0
24. Yang X, Li X and Zhou B. A Meta-Analysis of miR-499 rs3746444 Polymorphism for Cancer Risk of Different Systems: Evidence From 65 Case-Control Studies. *Front. Physiol*. (2018), 9:737. doi: 10.3389/fphys.2018.00737
25. Wang F, Sun G, Zou Y, et al. Association of microRNA-499rs3746444 polymorphism with cancer risk: evidence from 7188 cases and 8548 controls. *PLoS One*. (2012), (7)e45042.
26. Wu Y, Jia Z, Cao D, et al. Predictive Value of MiR-219-1, MiR-938, MiR-34b/c, and MiR-218 Polymorphisms for Gastric Cancer Susceptibility and Prognosis. *Dis Markers*. (2017), 4731891. doi:10.1155/2017/4731891
27. Torruella-Loran I, Ramirez Viña MK, Zapata-Contreras D, et al. rs12416605:C>T in MIR938 associates with gastric cancer through affecting the regulation of the CXCL12 chemokine gene. *Mol Genet Genomic Med*. (2019), 7(8):e832. doi:10.1002/mgg3.832
28. Kim WH, Min KT, Jeon YJ, et al. Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population. *Gene*, (2012), 504:92–7.
29. Arisawa T, Tahara T, Shiroeda H, et al. Genetic polymorphisms of IL17A and pri-microRNA-938, targeting IL17A 3'-UTR, influence susceptibility to gastric cancer. *Hum Immunol*. (2012), (7):747–752. doi:10.1016/j.humimm.2012.04.011

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Caracterização dos polimorfismos estudados e controle de qualidade.

GENE	rs	ALELOS	FUNÇÃO	CONTROLE DE QUALIDADE			
				MAF	Genotipagem	EHW*	Status
AGO1	rs636832	A > G	Intron variant	36%	80%	0,33887	Incluído
DROSHA	rs10035440	T > C	Intron variant	15%	81%	1,0000	Incluído
DROSHA	rs3805500	G > A	Intron variant	49%	83%	0,20689	Incluído
MIR146a	rs2910164	G > C	Mature miRNA variant	29%	86%	0,12694	Incluído
MIR219-1	rs213210	A > G	Regulatory region variant	17%	89%	0,02196	Incluído
MIR219-1	rs107822	C > T	TF binding site	37%	80%	0,07143	Incluído
MIR300	rs12894467	T > C	Non coding transcript exon variant	39%	90%	0,00204	Incluído
MIR499a	rs3746444	A > G	Mature miRNA variant	18%	86%	0,11173	Incluído
MIR608	rs4919510	G > C	Mature miRNA variant	36%	86%	1,0000	Incluído
PRE-MIR-938	rs2505901	C > T	Intron variant	40%	81%	0,00859	Incluído

* Significância ajustada para comparações múltiplas pela correção de Bonferroni ($p \leq 0,001$).

4. DISCUSSÃO GERAL

A população brasileira é uma das mais miscigenadas do mundo. Em nosso estudo encontramos uma miscigenação média de 42% europeia, 36% ameríndia e 20% africana, evidenciando um background genético muito diferenciado comparado com outras populações que investigaram SNPs em genes de microRNAs ou de sua maquinaria. Identificamos 3 SNPs associados com o risco de LLA, um localizado no gene *DROSHA* (rs3805500), envolvido na maquinaria de processamento de pri-miRNAs e pré-miRNAs; e dois presentes em genes de microRNAs: *MIR499* (rs3746444) e *PRÉ-MIR938* (rs2505901).

Os microRNAs são moléculas que atuam na regulação gênica e têm um papel importante no funcionamento de muitas vias biológicas. Alterações genéticas do tipo SNP em genes de microRNAs e genes envolvidos na sua síntese, como *AGO1* e *DROSHA*, têm sido relacionadas com a modulação do risco de vários tipos de câncer, inclusive LLA (LOPEZ-LOPEZ, *et al.* 2014; RYAN, *et al.* 2010; YANG, *et al.* 2018).

O gene *DROSHA* é um dos principais genes envolvidos na síntese dos microRNAs. Esse gene codifica uma Rnase tipo III, que é essencial para a maturação de pri-miRNAs e pré-miRNAs (PHUA, *et al.* 2011). Alguns estudos têm demonstrado que a presença de polimorfismos genéticos do tipo SNP no gene *DROSHA* pode influenciar no aumento do risco de LLA e outras leucemias (MARTIN-GUERRERO, *et al.* 2015; HASHEMI, *et al.* 2017). Em nossa análise observamos, para o gene *DROSHA*, que a presença do genótipo homozigoto mutante (AA) da variante rs3805500 eleva em até 3 vezes a susceptibilidade à LLA. Nenhum outro trabalho presente na literatura investigou o papel desse SNP sobre o risco de LLA.

Contudo, um estudo de GWAS envolvendo polimorfismos presentes em *DROSHA* identificou que a presença do alelo mutante (A) para essa variante, formando haplótipo com outros dois polimorfismos, foi associada com um aumento do risco de LLC (MARTIN-GUERRERO, *et al.* 2015). Os resultados encontrados por Martin-Guerrero e colaboradores (2015) ajudam a corroborar nossos achados, uma vez que o alelo mutante (A) contribui para o aumento do risco de leucemias. Sugere-se que vias compartilhadas no desenvolvimento

dessas leucemias podem ser influenciadas por polimorfismos em *DROSHA*. Além disso, o alelo mutante dessa variante encontra-se em desequilíbrio de ligação com a variante rs640831 no mesmo gene, que foi previamente relacionada com uma menor expressão do mRNA de *DROSHA*, alterando a maturação de pri-miRNAs e pré-miRNAs envolvidos na progressão de vários tipos de câncer (LOPEZ-LOPEZ, *et al.* 2014; MARTIN-GUERRERO, *et al.* 2015; MI, *et al.* 2007; SUGITO, *et al.* 2006; MURALIDHAR, *et al.* 2013; MERRITT, *et al.* 2008). Vale ressaltar que esse é o primeiro trabalho investigativo do efeito da variante rs3805500 sobre a susceptibilidade à LLA.

Proteínas argonautas, como AGO1, também possuem um papel importante na regulação gênica através da interferência de RNA. Elas participam do processo de maturação dos microRNAs e dirigem, junto com outros ligantes, os microRNAs até o seu mRNA alvo, atuando na regulação do processo de tradução (DOBRIJEVIĆ, *et al.* 2020; NAKANISHI, 2016). Várias pesquisas sugerem o forte envolvimento de membros da família Ago com processos de tumorigênese e metástase, onde foi observada a expressão desregulada de AGO em tecido tumoral em comparação com o tecido normal (LI, *et al.* 2010; SAND, *et al.* 2012; Ye, *et al.* 2015; VÖLLER, *et al.* 2016).

Em nossos resultados, não foi encontrada uma associação significativa entre a variante rs636832 em *AGO1* e o risco de desenvolvimento da LLA ($p = 0,163$). Poucos trabalhos investigaram o impacto de mutações nesse gene sobre o risco de câncer, os quais demonstraram que a presença do genótipo mutante está relacionada com a diminuição do risco de câncer de pulmão (DOBRIJEVIĆ, *et al.* 2020; KIM, *et al.* 2010). Vale ressaltar que esse é o primeiro trabalho a avaliar a associação entre a presença da variante rs636832 e o risco de LLA.

Além de genes da maquinaria de síntese dos microRNAs, tem-se observado que alterações genéticas pontuais nos genes de microRNAs podem levar a sua expressão aberrante, alterando vias que são geralmente reguladas por eles e aumentando o risco de diversas doenças, como o câncer (DROBNA, *et al.* 2018; RYAN, *et al.* 2010).

Pesquisas têm demonstrado que o gene MIR499a regula negativamente o gene PTEN, um importante supressor tumoral envolvido no controle da via de

sinalização PI3K / AKT / GSK, que possui um papel relevante na sobrevivência celular durante o processo cancerígeno. A baixa expressão de MIR-499-5p levou a uma diminuição da via PI3K / AKT / GSK, diminuindo o risco de câncer (WANG, *et al.* 2012; ANDO, *et al.* 2014; OKAMOTO, *et al.* 2016).

Em nosso estudo, investigamos o SNP rs3746444 localizado na região seed de MIR-499a-3p e corresponde a uma troca de A > G, que pode comprometer a ligação do microRNA aos seus alvos (HASANI, *et al.* 2014; GUTIERREZ-CAMINO, *et al.* 2014). Nossos resultados mostraram uma forte associação entre a presença do genótipo homozigoto mutante (GG) e o aumento, em até 17 vezes, do risco de desenvolvimento da LLA.

Trabalhos que investigaram a presença dessa variante têm apresentado resultados controversos relacionados à sua associação com o risco de câncer. Em alguns deles, observou-se que o genótipo mutante (GG) da variante rs3746444 é relacionado com maior susceptibilidade aos cânceres de pulmão, próstata e carcinoma hepatocelular. Em contrapartida, outras investigações da mesma variante não encontraram associação significativa com o risco de câncer gástrico, câncer de mama, pulmão e colorretal (TIAN, *et al.* 2009; CATUCCI, *et al.* 2010; MIN, *et al.* 2007). Destacamos que aumento do risco de câncer, associado a essa variante, foi observado na população asiática, mas não em caucasianos (YANG, *et al.* 2018; WANG, *et al.* 2012)

Até o momento, apenas um trabalho presente na literatura buscou investigar o papel do polimorfismo rs3746444 sobre o risco de desenvolvimento da LLA. Este trabalho sugeriu que a presença do alelo mutante (G) da variante rs3746444, confere um efeito de proteção no desenvolvimento da LLA. Vale destacar que este estudo foi realizado em uma população europeia, com perfil de ancestralidade genética homogênea, consideravelmente distinta da população miscigenada investigada em nosso trabalho.

A inconsistência desses resultados se deve em parte a diferentes backgrounds genéticos de diferentes tipos de câncer e a diferenças étnicas entre as populações estudadas (HASANI, *et al.* 2014). Esses achados mostram a influência da etnicidade sobre investigações genéticas em populações etnicamente distintas, refletindo a importância do controle genômico de

ancestralidade, como realizado em nosso trabalho. Para melhor esclarecer a relação entre o polimorfismo rs3746444 e o risco de LLA, são necessárias mais investigações que levem em consideração a caracterização étnica das populações.

O MIR938 é um importante microRNA envolvido nas vias regulatórias de genes relacionados com sobrevivência e apoptose celular [38]. Variantes do tipo SNP presentes no gene *MIR938* foram associadas com a alteração da sua biogênese e estabilidade (WU, *et al.* 2017; TORRUELLA-LORAN, *et al.* 2019). Nós investigamos a variante rs2505901, que corresponde a uma mudança C>T região intrônica do gene *MIR938*. Nossos resultados demonstraram uma diminuição de 33% no risco de LLA em pessoas com o genótipo selvagem dessa variante (CC). Vale ressaltar que poucos trabalhos investigaram o papel desse polimorfismo no desenvolvimento do câncer, e nenhum deles avaliou seu papel na LLA.

Corroborando o efeito protetor da variante rs2505901, foi observada uma diminuição do risco de câncer gástrico, em indivíduos portadores do genótipo homozigoto selvagem (CC) (ARISAWA, *et al.* 2012). Entretanto, outro trabalho também em pacientes com câncer gástrico, não observou associação entre o rs2505901 e a susceptibilidade ao câncer (WU, *et al.* 2017). A função do polimorfismo rs2505901 e seus efeitos na susceptibilidade da LLA ainda não são claros. Por conseguinte, são necessários mais estudos que somem com os conhecimentos atuais a respeito desse polimorfismo, e que ajudem a esclarecer seu papel sobre a susceptibilidade à LLA.

Com relação ao MIR219-1, pesquisas tem demonstrado seu papel regulatório em vias relacionadas com a transcrição, processos metabólicos de RNAs e transcrição da RNA polimerase II (WU, *et al.* 2017). Ademais, observou-se que a alta expressão de MIR219-1 induz a diminuição da proliferação e migração celular em câncer de pâncreas. Sugerimos que a presença de SNPs nesse gene altere os níveis de expressão do mesmo, desregulando diversas vias. Nosso trabalho investigou os polimorfismos rs213210 e rs107822 em *MIR219-1* e seu papel no risco de LLA. Não observamos diferenças significativas entre os grupos caso e controle para os dois polimorfismos.

Poucos trabalhos investigaram a função dessas variantes na susceptibilidade a outros tipos de câncer, principalmente do sistema digestório. Wu *et al.* (2017) sugere que o genótipo homozigoto selvagem da variante rs213210 está relacionado com a diminuição do risco de câncer gástrico (WU, *et al.* 2017). Para a mesma variante, apenas um trabalho investigou o papel do polimorfismo rs213210 em pacientes com LLA. Neste, foi observado que a presença do alelo variante confere um maior risco de recaída após o transplante de células tronco (CHEN, *et al.* 2019). Sugerimos que mais trabalhos sejam realizados afim de melhor esclarecer o papel de polimorfismos no gene *MIR219-1* sobre o risco de LLA.

O MIR146a é um dos principais microRNAs envolvidos na diferenciação celular e processos relacionados à imunidade inata e adaptativa. Dada sua importância nesses processos biológicos, a desregulação da expressão desse microRNA ou alterações em sua estrutura sejam frequentemente observadas em desordens humanas, como o câncer (IRIYAMA, *et al.* 2012; WANG, *et al.* 2012; HE, *et al.* 2005; PEI, *et al.* 2020).

O polimorfismo rs2910164 presente no gene *MIR146A* corresponde a uma substituição G>C e leva a uma redução na expressão de miR146a maduro. Em nosso trabalho não observamos associação entre o esse polimorfismo e o risco de desenvolver LLA na população estudada. Em contrapartida, Hasani e col. (2014) encontraram uma associação entre o genótipo homozigoto mutante (CC) e o risco elevado de LLA. Também foi sugerido por Pei e col. 2020, que o alelo selvagem G serve como marcador de proteção para LLA em uma população do Taiwan (HASANI, *et al.* 2014; PEI, *et al.* 2020).

Trabalhos controversos associando o polimorfismo rs2910164 no MIR146A ao risco de câncer são frequentemente observados na literatura. Por exemplo, o alelo mutante C foi relacionado com o aumento do risco de câncer de próstata, câncer de mama e carcinoma hepatocelular (MI Y, *et al.* 2015; LIAN, *et al.* 2015; QI P, *et al.* 2015; WANG Z, *et al.* 2014). Contudo, uma meta-análise sugeriu que o genótipo selvagem (GG) dessa variante contribui para o aumento do risco de câncer gástrico e câncer de mama (XU Z, *et al.* 2014; NEJATI-AZAR, *et al.* 2018), além de encontrar fortes indícios de que o alelo variante C não aumente o risco dos cânceres gástrico, oral, colorretal e de pulmão (CHU, *et al.* 2012; MIN KT, *et*

al. 2012; DU, *et al.* 2014; TIAN, *et al.* 2009). Mais uma vez, esses resultados distintos podem ser explicados por diferenças étnicas entre as populações estudadas, como sugere PEI e col. 2020 (PEI, *et al.* 2020).

O SNP rs12894467 (T>C) presente no gene *MIR300* já foi investigado e relacionado com alguns tipos de câncer. Em nossa pesquisa não observamos uma relação significativa entre esse polimorfismo e o risco de LLA. Para esse tipo de câncer, apenas um trabalho presente na literatura investigou o papel do polimorfismo rs12894467 sobre o risco da doença, o qual encontrou um efeito de risco associado ao alelo mutante (LOPEZ-LOPEZ, *et al.* 2014). Outros trabalhos também têm observado uma relação entre a presença desse polimorfismo com o aumento do risco de câncer de pulmão e osteossarcoma (LIU, *et al.* 2018; MARTIN-GUERRERO, *et al.* 2018). Destacamos que este é um dos primeiros trabalhos a investigar esse polimorfismo associado com o risco de LLA, sendo o primeiro a investigar uma população miscigenada. Sugerimos que mais estudos sejam realizados afim de compreender o papel desse polimorfismo sobre o risco de LLA.

Por fim, investigamos o polimorfismo rs4919510 (G>C) presente no gene *MIR608*. Em nosso trabalho, não identificamos associação significativa entre esse polimorfismo e o risco de LLA na população estudada. Esse polimorfismo vem sendo frequentemente estudado em diversos tipos de câncer e, assim como outros polimorfismos aqui estudados, têm refletido uma ampla heterogeneidade de resultados da sua associação com o risco de câncer. Contudo, nenhum destes trabalhos investigou o papel desse polimorfismo sobre o risco de LLA.

Duas meta-análises desenvolvidas por Wang J *et al.* (2017) e Li-Xue *et al.* (2018) não encontraram relação entre o polimorfismo rs4919510 e o aumento do risco de câncer de mama e cânceres do sistema digestivo, respectivamente (WANG J, *et al.* 2017; LI-XUE, *et al.* 2018). Ademais, o alelo variante desse polimorfismo tem sido relacionado com o efeito protetor contra diversos tipos de câncer (WU S, *et al.* 2017; LIU H, *et al.* 2017; HASHEMI, *et al.* 2016). Importante ressaltar que na meta-análise realizada por LI-XUE, *et al.* (2018), observou-se diferença no efeito protetor da variante de acordo com a etnicidade, onde o efeito protetor foi observado em caucasianos, mas não em asiáticos.

Em suma, os resultados do nosso trabalho são únicos no cenário mundial, uma vez que nossa população de estudo é altamente miscigenada, com uma constituição genética diferenciada de populações etnicamente homogêneas que compõem outros estudos. Sugerimos que os SNPs rs3805500, rs3746444 e rs2505901 presentes, respectivamente, nos genes *DROSHA*, *MIR499* e *MIR938* possam potencialmente ser utilizados como biomarcadores preditivos de susceptibilidade à LLA. Por fim, do ponto de vista metodológico, a utilização de SNPs como biomarcadores é vantajoso comparado à expressão de mRNA, uma vez que a genética germinativa pode ser facilmente investigada a partir do sangue periférico, com técnicas menos laboriosas e de menor custo.

5. REFERÊNCIAS

- Aifantis I, Raetz E e Buonomici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immuno.* (2008), 8:380–90. doi: 10.1038/nri2304
- Ando H, Asai T, Koide H, et al. Advanced cancer therapy by integrative antitumor actions via systemic administration of miR-499. *J Control Release.* (2014), 181:32–39. doi:10.1016/j.jconrel.2014.02.019
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, (2016), 6;127(20):2391-2405
- Arisawa T, Tahara T, Shiroeda H, et al. Genetic polymorphisms of IL17A and pri-microRNA-938, targeting IL17A 3'-UTR, influence susceptibility to gastric cancer. *Hum Immunol.* (2012), (7):747–752. doi:10.1016/j.humimm.2012.04.011
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* (2009), 136(2):215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Bennett M. The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukaemia : Concordance among Observers and Clinical Correlations, (1981), 553–61
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* (2018), 68(6):394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Brisson GD, Alves LR, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review. *Ecancermedalscience.* (2015), (9)539, doi:10.3332/ecancer.2015.539
- Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, et al. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*, (2016), (64), 2:320–333. doi:10.1016/j.molcel.2016.09.004
- Caldas C and Brenton JD. Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat Med.* (2005), 11(7):712–714. doi:10.1038/nm0705-712
- Calin GA and Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Cancer.* (2006), 6(11):857–866. doi:10.1038/nrc1997
- Carroll WL e Raetz EA. Clinical and laboratory biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr.* (2012), 160:10–8. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.08.006.
- Carvalho DC, Wanderley AV, Amador MA, et al. Amerindian genetic ancestry and INDEL polymorphisms associated with susceptibility of childhood B-cell

- Leukemia in an admixed population from the Brazilian Amazon, *Leuk Res*, (2015), doi: 10.1016/j.leukres.2015.08.008
- Carvalho DC, Wanderley AV, Dos Santos AMR, et al. Pharmacogenomics and variations in the risk of toxicity during the consolidation/maintenance phases of the treatment of pediatric B-cell leukemia patients from an admixed population in the Brazilian Amazon. *Leuk Res*. (2018), 74:10–13. doi:10.1016/j.leukres.2018.09.003
- Carvalho DC, Wanderley AV, Mello Junior FAR, et al. Association of genes *ARID5B*, *CEBPE* and folate pathway with acute lymphoblastic leukemia in a population from the Brazilian Amazon region, *Leuk Res Rep*, (13), (2019), 100188. doi:10.1016/j.lrr.2019.100188
- Catucci I, Yang R, Verderio P, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Hum Mutat*. (2010), 31:E1052–7.
- Cepi P and Peter ME. MicroRNAs regulate both epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Oncogene*. (2014), 33, 269–278.
- Chen M, Chang CH, Tao L, et al. Residential exposure to pesticide during childhood and childhood cancers: a meta-analysis. *Pediatrics* (2015), 136:719e729.
- Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, (2014), 6(1): e2014073, DOI: 10.4084/MJHID.2014.073
- Chow EJ, Puumala SE, Mueller BA, et al. Childhood cancer in relation to parental race and ethnicity a 5-state pooled analysis. *Cancer*. (2010), 116, 3045–3053. doi: 10.1002/cncr.25099.
- Chu YH, Tzeng SL, Lin CW, et al. Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer. *PLoS One* 7: e39777
- Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al: Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*, (2009), 10:147-156. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70314-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70314-0)
- Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. (2009),10(2):125-134.
- D'Onofrio G, Zini G, Bain BJ (Translator). *Morphology of Blood Disorders*, 2nd Edition. (2014). Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-118- 44260)
- Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Dawidowska M. T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers, *Blood Ver*, 32(6). (2018), 457–472, doi:10.1016/j.blre.2018.04.003

- Du W, Ma XL, Zhao C, et al. Associations of single nucleotide polymorphisms in miR-146a, miR-196a, miR-149 and miR-499 with colorectal cancer susceptibility. (2014) *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 1047-1055. PMID: 24568449. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.2.10472 2
- Ellwanger DC, Buttner FA, Mewes HW, et al, The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics*, (27), (2011), 1346–50.
- Faderl S, Jeha S e Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. (2003), 98:1337–1354. doi: 10.1002/cncr.11664
- Fernandes MR, de Carvalho DC, dos Santos ÂK, dos Santos SE, de Assumpção PP, Burbano RM and dos Santos NP: Association of slow acetylation profile of NAT2 with breast and gastric cancer risk in Brazil. *Anticancer Res*. (2013), 33(9): 3683-3689.
- Flandrin G. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *British Journal of Haematofogy*, (1976), 33; 451.
- Garte S. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, (1998), 19(8):1329–1332. doi:10.1093/carcin/19.8.1329
- Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. (2008), 111:3183–9.
- Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. (2007), 27:91–105.
- Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, et al. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. (2009), 114(3):647–650.
- Gutierrez-camino A, Lopez-lopez E, Martin-guerrero I, Piñan MA, Garcia-miguel P. Noncoding RNA–related polymorphisms in pediatric acute lymphoblastic leukemia susceptibility. (2014), 1–7. doi:10.1038/pr.2014.43.
- Gutierrez-Camino A, Umerez M, Santos B, et al. Pharmacoeugenetics in childhood acute lymphoblastic leukemia: involvement of miRNA polymorphisms in hepatotoxicity. *Epigenomics*. (2018), 10(4):409–417. doi:10.2217/epi-2017-013
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2014), 15(8):509–524. doi:10.1038/nrm3838
- Harrison CJ, Foroni L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. (2002), 6(2):91–113
- Harrison CJ. Blood spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood*. (2015), 125, 1383e1386.

- Hasani SS, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Naderi M, Omrani M, Sheybani-Nasab M. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a preliminary report. *Tumour Biol.* (2014), 35(1):219–225.
- Hashemi M, Bahari G, Naderi M, Sadeghi-Bojd S, Taheri M. Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism is associated with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet.* (2016), 209(11):493–496. doi:10.1016/j.cancergen.2016.09.009
- Hashemi M, Hasani SS, Naderi M. DROSHA rs642321 Polymorphism Influence Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Preliminary Report. *Indian J Med Paediatr Oncol*, (38), (2017),4:416–419. doi:10.4103/ijmpo.ijmpo_4_15
- Hashemi M, Sanaei S, Rezaei M, et al. miR-608 rs4919510 C>G polymorphism decreased the risk of breast cancer in an Iranian subpopulation. (2016).*Exp Oncol.* 38(1):57-59.
- He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. (2005). *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19075-19080. PMID: 16365291. doi: 10.1073/pnas.0509603102
- He J, Zhao J, Zhu W, et al. MicroRNA biogenesis pathway genes polymorphisms and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ.* (2016), 4:e2706 <https://doi.org/10.7717/peerj.2706>
- Howlader, N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. Bethesda: National Cancer Institute, (2017). Disponível em:<https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/>.
- Hunger SP and Mullighan CG. Acute lymphoblastic leucemia in childre. *N Engl J Med*, (2015), 373:1541-52. DOI: 10.1056/NEJMra1400972
- Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva – INCA/ Ministério da Saúde. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, (2019), p 41.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC. (2016). Available at: <http://monographs.iarc.fr/>. Accessed October 10, 2016.
- Iriyama N, Yoshino Y, Yuan B, Horikoshi A, et al. Speciation of arsenic trioxide metabolites in peripheral blood and bone marrow from an acute promyelocytic leukemia patient. (2012). *J Hematol Oncol* 5: 1. doi: 10.1186/1756-8722-5-1
- Izraeli, S., Vora, A., Zwaan, C.M., Whitlock, J. How I treat ALL in Down's syndrome: pathobiology and management. *Blood.* (2014), 123, 35e40.

- Ju X, Li D, Shi Q, et al. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* (2009), 26:1–10.
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2005), 6:376–85. doi:10.1038/nrm1644
- Kim WH, Min KT, Jeon YJ, et al. Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population. *Gene*, (2012), 504:92–7.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* (2010), 11:597–610.
- Lai R, Hirsch-Ginsberg CF, Bueso-Ramos C. Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia, *Hematol Oncol Clin North Am*, (2000), 14:1209-1235. [http://dx.doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70183-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70183-0)
- Leonard JP, Martin P, Roboz GJ. Practical Implications of the 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid and Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. (2019), 35(23)
- Li M, Zhang S, Wu N, et al. Overexpression of miR-499-5p inhibits non-small cell lung cancer proliferation and metastasis by targeting VAV3. *Sci. Rep.* (2016), 6:23100. doi: 10.1038/srep23100
- Li XF, Song JK, Cai JW, et al. No Association Between MicroRNA-608 rs4919510 G>C Polymorphism and Digestive System Cancers Susceptibility: A Meta-Analysis Based on 10,836 Individuals. (2018). *Front Physiol.* 9:705. doi:10.3389/fphys.2018.00705
- Li Y, Schwab C, Ryan SL, et al. Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* (2014), 508, 98e102.
- Lian H, Wang L and Zhang J. Increased risk of breast cancer associated with CC genotype of Has-miR-146a Rs2910164 polymorphism in Europeans. (2012) *PLoS One* 7: e31615. PMID: 22363684. DOI: 10.1371/journal.pone.0031615 4
- Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* (2015), 15(6):321–333. doi:10.1038/nrc3932
- Linnet MS, Brown LM, Mbulaiteye SM, et al. International long-term trends and recent patterns in the incidence of leukemias and lymphomas among children and adolescents ages 0-19 years. *Int J Cancer.* (2016), 138(8):1862–1874. doi:10.1002/ijc.29924
- Liu H, Zhou Y, Liu Q, et al. Association of miR-608 rs4919510 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 13,664 subjects. (2017). *Oncotarget.* 8(23):37023-37031. doi:10.18632/oncotarget.9509
- Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, et al. Pharmacogenetics of microRNAs and

- MicroRNAs Biogenesis Machinery in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS ONE* 9(3), (2014), e91261.
doi:10.1371/journal.pone.0091261
- Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, et al. Pharmacogenetics of microRNAs and MicroRNAs Biogenesis Machinery in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS ONE* 9(3), (2014), e91261.
doi:10.1371/journal.pone.0091261
- Martin-Guerrero I, Bilbao-Aldaiturriaga N, Gutierrez-Camino A, et al. Variants in the 14q32 miRNA cluster are associated with osteosarcoma risk in the Spanish population. (2018) *Sci. Rep*, 8:15414 | DOI:10.1038/s41598-018-33712-4
- Martin-Guerrero I, Gutierrez-Camino A, Lopez-Lopez E, et al. Genetic Variants in MiRNA Processing Genes and Pre MiRNAs Are Associated with the Risk of Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE*, (2015), 10(3):e0118905.
doi:10.1371/journal.pone.0118905
- Mavrakis KJ, Van der Meulen J, Wolfe AL, et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nature genetics*. (2011), 43(8):815-815.
- Merritt WM, Lin YG, Han LY, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*. (2008), (359)2641–50. doi:10.1056/NEJMoa0803785
- Mi S, Lu J, Sun M, et al. MicroRNA expression. Signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leucemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2007), 104:19971–6. PMID:18056805
- Mi Y, Ren K, Zou J, et al. The association between three genetic variants in microRNAs (rs11614913, rs2910164, rs3746444) and prostate cancer risk. (2018) *Cell Physiol Biochem* 48: 149-157. PMID: 30001553. DOI: 10.1159/0004916711
- Min KT, Kim JW, Jeon YJ, et al. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. (2012) *Mol Carcinog* 51(Suppl 1): E65-73. PMID: 22161766. DOI: 10.1002/mc.21849
- Min KT, Kim JW, Jeon YJ, et al. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. *Mol Carcinog*. (2012), (51)1:E65–E73.
doi:10.1002/mc.21849
- Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leucemia. *Semin Hematol*. (2013), 50(4):
doi:10.1053/j.seminhematol.2013.10.001.

- Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, et al. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J Pathol.* (2007) (212):368–77. PMID:17471471
- Nejati-Azar A and Alivand MR. miRNA 196a2(rs11614913) & 146a(rs2910164) polymorphisms & breast cancer risk for women in an Iranian population. (2018) *Per Med* 15: 279-289. PMID: 29965793. DOI: 10.2217/pme-2017-00881 8
- Nouri R, Ghorbani S. Association of single nucleotide polymorphism in hsa-miR-499 and hsa-miR-196a2 with the risk of prostate cancer. *Int Urol Nephrol.* (2019), 51(5):811–816. doi:10.1007/s11255-019-02099-0
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol*, (2018), (9),402, doi:10.3389/fendo.2018.00402
- Okamoto A, Asai T, Ryu S, et al. Enhanced Efficacy of Doxorubicin by microRNA-499-Mediated Improvement of Tumor Blood Flow. *J Clin Med.* (2016), (5),1:10. doi:10.3390/jcm5010010
- Oliveira JC, Brassesco MS, Scrideli CA, et al A. MicroRNA expression and activity in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Pediatr Blood Cancer.* (2012), 59(4):599–604. doi:10.1002/pbc.24167
- Oliveira JC, Molinari RG, Baroni M, et al. MiRNA Dysregulation in Childhood Hematological Cancer. *Int J Mol Sci.* (2018), 19(9):2688. Published 2018 Sep 10. doi:10.3390/ijms19092688
- Oliveira JC, Scrideli CA, Brassesco MS, et al. Differential MiRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. *Leuk Res.* (2011), 36:293– 298.
- Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Clin NA* [Internet]. (2009), 23(4):655–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009>
- O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med.* (2007), 204(8):1813–1824.
- Pei JS, Chang WS, Hsu PC. Significant Association Between the MiR146a Genotypes and Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Taiwan. (2020). *Cancer Genomics & Proteomics* 17: 175-180. doi: 10.21873/cgp.20178
- Phua SL, Sivakamasundari V, Shao Y, et al. Nuclear accumulation of na uncapped RNA produced by Drosha cleavage of a transcript encoding miR-10b and HOXD4. *PLoSOne.* (6), (2011), e25689. doi:10.1371/journal.pone.0025689
- Pritchard JK, Donnelly P. Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theor Popul Biol*, (60), (2001), 227–237.

- Pui CH, Acute lymphoblastic leukemia. In: Pui CH, editor. Childhood leukemias. New York: Cambridge University Press, (2006), p. 439–7
- Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S e Arceci RJ. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *J Clin Oncol*, (2011), 29:551–565. doi: 10.1200/JCO.2010.30.7405.
- Pui CH, Nichols KE, Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. (2019), 16(4):227–240. doi:10.1038/s41571-018-0136-6
- Qi P, Wang L, Zhou B, et al. Associations of miRNA polymorphisms and expression levels with breast cancer risk in the Chinese population. (2015) *Genet Mol Res* 14: 6289-6296. PMID: 26125831. DOI: 10.4238/2015.June.11.21 5
- Ramos BR de A, D'Elia MPB, Amador MAT, et al. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica*. (2016), 1–7. doi: 10.1007/s10709-016-9894-1
- Roberts, K. G. & Mullighan, C. G. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. (2015), 12, 344–357.
- Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*, (2010), 10:389–402.
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, et al. Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48 – Insertion-Deletion. *Hum Mutat*. (2010), 31(2):184-90
- Schmiegelow K, Levinsen MF, Attarbaschi A, et al. Second malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. (2013), 31:2469e2476.
- Schüz J, Erdmann F. Environmental Exposure and Risk of Childhood Leukemia: An Overview. *Arch Med Res*. (2016), 47(8):607–614. doi:10.1016/j.arcmed.2016.11.017
- Sevilla DW, Colovai AI, Emmons FN, et al. Hematogones: a review and update. *Leuk Lymphoma*, (2010), 51:10-19. <http://dx.doi.org/10.3109/10428190903370346> PMID:20001239
- Silva EM, Fernandes MR, de Carvalho DC, et al. Effect of genetic ancestry to the risk of susceptibility to gastric cancer in a mixed population of the Brazilian Amazon. *BMC Res Notes*. (2017), 10:646. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2963-4>.
- Suarez-Kurtz G, Paula DP, Struchiner CJ. Pharmacogenomic implications of population admixture: Brazil as a model case Review. *Pharmacogenomics*. (2014), 15(2):209-19. doi: 10.2217/pgs.13.238

- Sugito N, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res.* (2006), (12), 7322–8.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press. (2008). p. 157–78
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The updated who classification of hematological malignancies the 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. (2016), 127(20):2375–91
- Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* (2017), 7(6):e577.
- Tian T, Shu Y, Chen J, et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. (2009) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 1183-1187. PMID: 19293314. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-08142
- Tian T, Shu Y, Chen J, et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2009), 18:1183–7.
- Tong N, Xu B, Shi D, et al. Hsa-miR-196a2 polymorphism increases the risk of acute lymphoblastic leukemia in Chinese children. *Mutat Res.* (2014), 759:16–21. doi:10.1016/j.mrfmmm.2013.11.004
- Torruella-Loran I, Laayouni H, Dobon B, et al. MicroRNA genetic variation: From population analysis to functional implications of three allele variants associated with cancer. *Human Mutation*, (2016), 37(10), 1060–1073. <https://doi.org/10.1002/humu.23045>
- Torruella-Loran I, Ramirez Viña MK, Zapata-Contreras D, et al. rs12416605:C>T in MIR938 associates with gastric cancer through affecting the regulation of the CXCL12 chemokine gene. *Mol Genet Genomic Med.* (2019), 7(8):e832. doi:10.1002/mgg3.832
- Tosello V, Mansour MR, Barnes K, Paganin M, Sulis ML, Jenkinson S, et al. WT1 mutations in TALL. *Blood.* (2009), 114(5):1038–1045.
- Van Maele-Fabry G, Lantin AC, Hoet P, et al. Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: a systematic review and metaanalysis. *Environ Int.* (2011), 37:280e291
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* (2009);114:937-951
- Vijayakrishnan J, Studd J, Broderick P, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for B-cell childhood acute lymphoblastic

leucemia. *Nat Commun*, (2018), 9(1):1340. doi:10.1038/s41467-018-03178-z

- Wallaert A, Van Loocke W, Hernandez L, et al. Comprehensive miRNA expression profiling in human T-cell acute lymphoblastic leukemia by small RNA-sequencing. *Sci Rep*. (2017), 7:7901–8.
- Walsh KM, Chokkalingam AP, Hsu L-I, et al, Associations between genome-wide Native American ancestry, known risk alleles and B-cell ALL risk in Hispanic children. *Leukemia* (27). (2013), 2416–2419. doi: 10.1038/leu.2013.130.
- Wang AX, Xu B, Tong N, et al. Meta-analysis confirms that a common G/C variant in the pre-miR-146a gene contributes to cancer susceptibility and that ethnicity, gender and smoking status are risk factors (2012). *Genet Mol Res* 11: 3051-3062, PMID: 23007982. doi: 10.4238/2012.August.31.2
- Wang F, Sun G, Zou Y, et al. Association of microRNA-499rs3746444 polymorphism with cancer risk: evidence from 7188 cases and 8548 controls. *PLoS One*. (2012), (7)e45042.
- Wang J, Kong X, Xing Z, et al. A meta-analysis: Is there any association between MiR-608 rs4919510 polymorphism and breast cancer risks?. (2017). *PLoS One*. 12(8):e0183012. doi:10.1371/journal.pone.0183012
- Wang Z, Zhang L, Shi X, et al. Association between two common polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma: evidence from an updated meta-analysis. (2014) *Biomed Res Int*. 468605, 2014. PMID: 24860819. DOI: 10.1155/2014/4686051
- Ward E, Desantis C, Robbins A, et al, Childhood and Adolescent Cancer Statistics, *Ca Cancer J Clin* (64) (2014), 83–103, doi: 10.3322/caac.21219.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. (2004), 306(5694): 269–271.
- Wilson KD, Hu S, et al. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499. *Circ. Cardiovasc. Genet*. (2010), 3, 426–435. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.109.934281
- Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ. Practical aspects of microRNA target prediction. *Curr Mol Med*. (2011), 11:93–109.
- Wu S, Yuan W, Shen Y, et al. The miR-608 rs4919510 polymorphism may modify cancer susceptibility based on type. (2017). *Tumour Biol*. 39(6):1010428317703819. doi:10.1177/1010428317703819
- Wu Y, Jia Z, Cao D, et al. Predictive Value of MiR-219-1, MiR-938, MiR-34b/c, and MiR-218 Polymorphisms for Gastric Cancer Susceptibility and Prognosis. *Dis Markers*. (2017), 4731891. doi:10.1155/2017/4731891

- Xu H, Yang W, Perez-Andreu V, Devidas M, Fan Y, Cheng C, et al. Novel susceptibility variants at 10p12.31-12.2 for childhood acute lymphoblastic leukemia in ethnically diverse populations. *J Natl Cancer Inst.* (2013), 105:733–742
- Xu Z, Zhang L, Cao H and Bai B. MiR-146a rs2910164 G/C polymorphism and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. (2014) *BMC Med Genet* 15: 117. PMID: 25326754. DOI: 10.1186/s12881-014-0117-21 7
- Yang X, Li X and Zhou B. A Meta-Analysis of miR-499 rs3746444 Polymorphism for Cancer Risk of Different Systems: Evidence From 65 Case-Control Studies. *Front. Physiol.* (2018), 9:737. doi: 10.3389/fphys.2018.00737
- Yuan Y, Weidhaas JB. Functional microRNA binding site variants. *Mol Oncol.* (2019), 13(1):4–8. doi:10.1002/1878-0261.12421
- Zhang H, Luo XQ, Zhang P, et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. *PLoS ONE.* (2009), 4:e7826.
- Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, Wu G, Chen X, Edmonson M, Buetow KH, Carroll WL, Chen I, Devidas M et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia : a report from the Children ' s Oncology Group. *Blood.* (2011), 118:3080–3087. doi: 10.1182/blood-2011-03-341412.
- Zhang LH, Hao BB, Zhang CY, Dai XZ, Zhang F. Contributions of polymorphisms in miR146a, miR196a, and miR499 to the development of hepatocellular carcinoma. *Genet Mol Res.* (2016), (15)3: doi:10.4238/gmr.15038582

ANEXOS

ANEXO I - Pharmacogenomics and variations in the risk of toxicity during the consolidation/maintenance phases of the treatment of pediatric B-cell leukemia patients from an admixed population in the Brazilian Amazon. (2018).

ANEXO II - Association of genes *ARID5B*, *CEBPE* and folate pathway with acute lymphoblastic leukemia in a population from the Brazilian Amazon region. (2019).

ANEXO III - The Metabolization Profile of the *CYP2D6* Gene in Amerindian Populations: A Review. (2020)

ANEXO IV – Parecer do comitê de ética em pesquisa

ANEXO I - Pharmacogenomics and variations in the risk of toxicity during the consolidation/maintenance phases of the treatment of pediatric B-cell leukemia patients from an admixed population in the Brazilian Amazon. (2018).

Leukemia Research 74 (2018) 10–13



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres



Pharmacogenomics and variations in the risk of toxicity during the consolidation/maintenance phases of the treatment of pediatric B-cell leukemia patients from an admixed population in the Brazilian Amazon



Darlen Cardoso de Carvalho^a, Alayde Vieira Wanderley^{a,c}, André Mauricio Ribeiro dos Santos^b, Marianne Rodrigues Fernandes^a, Amanda de Nazaré Cohen Lima de Castro^a, Luciana Pereira Colares Leitão^a, João Augusto Nunes de Carvalho Junior^a, Tatiane Piedade de Souza^a, André Salim Khayat^a, Sidney Emanuel Batista dos Santos^{a,b}, Paulo Pimentel de Assumpção^{a,d}, Ney Pereira Carneiro dos Santos^{a,b,*}

^a Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Rua dos Mundurucus, 4487, CEP 66073-000, Belém, Pará, Brazil

^b Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Cidade Universitária Prof. José Silveira Netto, 01 - CEP 66075-900, Belém, Pará, Brazil

^c Hospital Ophir Loyola, Departamento de Pediatria, Avenida Governador Magalhães Barata, 992, CEP 66060-281, Belém, Pará, Brazil

^d Hospital Universitário João de Barros Barreto, Rua dos Mundurucus, 4487, CEP 66073-000, Belém, Pará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Pharmacogenetics
Pediatrics
ALL
SLCO1B1
ABCC3

ABSTRACT

The treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in children has a high clinical success rate, although toxicological complications are frequent, and often result in the interruption of the treatment. Various studies have shown that toxicities resulting from the treatment are influenced by pharmacogenetic variants. Most of this research has focused on relatively homogeneous populations, and the influence of these variants in highly admixed populations, such as that of Brazil, is still poorly understood. The present study investigated the association between pharmacogenetic variants and severe toxicities in pediatric B-cell ALL patients from an admixed population of the Brazilian Amazon. The rs2306283 (of *SLCO1B1*) mutant allele increased the risk of neurotoxicity threefold, and the homozygous mutant rs9895420 (of *ABCC3*) genotype was associated with a fivefold increase in protection against severe gastrointestinal toxicity. This indicates that the rs2306283 and rs9895420 polymorphisms may be relevant to the prediction of severe toxicity in pediatric ALL patients.

1. Introduction

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common childhood cancer, representing approximately 30% of all malignant pediatric neoplasia [1,2]. In about 85% of children with ALL, the leukemia starts in the B cells (B-cell ALL). Recent advances in the chemotherapy of childhood ALL, based on a cocktail of chemotherapeutic drugs that includes inhibitors of tyrosine kinases, have resulted in survival rates of > 90% [3]. Despite the clinical success of this treatment, around 20% of the children present serious toxicological complications that require a reduction in the dosage or even the complete interruption of the treatment [4].

The drugs 6-mercaptopurine (6-MP) and Methotrexate (MTX) are the key components of this cocktail, and are administered during both the consolidation and the maintenance phases of the ALL treatment. Various studies have shown that toxicities resulting from the treatment are influenced by pharmacogenetic variants [5–7]. Most of this research has focused on relatively homogeneous populations and the influence of these variants in highly admixed populations, such as that of Brazil, is still poorly understood [8]. In populations of Hispanic ethnicity, which mix European, African, and native American ancestries, children tend to have worse results in the treatment of ALL in comparison with European, American, and Asian populations, and require more intensive treatment. This disparity may be accounted for, at least in part,

* Corresponding author at: Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Rua dos Mundurucus, 4487, CEP 66073-000, Belém, Pará, Brazil.

E-mail addresses: darlen.c.carvalho@gmail.com (D.C. de Carvalho), alaydevieira@yahoo.com.br (A.V. Wanderley), andremrsantos@gmail.com (A.M.R. dos Santos), fernandesmr@yahoo.com.br (M.R. Fernandes), acohencastro@gmail.com (A.d.N. Cohen Lima de Castro), colaresluciana@gmail.com (L.P.C. Leitão), jocarvalho81@gmail.com (J.A.N. de Carvalho), xtatissouza@gmail.com (T.P. de Souza), khayatas@gmail.com (A.S. Khayat), sidneysantos@ufpa.br (S.E.B. dos Santos), assumpcao@gmail.com (P.P. de Assumpção), npcasantos@yahoo.com.br (N.P.C. dos Santos).

<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.09.003>

Received 20 May 2018; Received in revised form 29 August 2018; Accepted 11 September 2018

Available online 15 September 2018

0145-2126/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ANEXO II - Association of genes *ARID5B*, *CEBPE* and folate pathway with acute lymphoblastic leukemia in a population from the Brazilian Amazon region. (2019).

Leukemia Research Reports 13 (2020) 100188



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lrr



Association of genes *ARID5B*, *CEBPE* and folate pathway with acute lymphoblastic leukemia in a population from the Brazilian Amazon region



Darlen Cardoso Carvalho^a, Alayde Vieira Wanderley^{a,c},
Fernando Augusto Rodrigues Mello Junior^a, André Mauricio Ribeiro dos Santos^b,
Luciana Pereira Colares Leitão^a, Tatiane Piedade de Souza^a,
Amanda de Nazaré Cohen Lima de Castro^a, Leandro Lopes de Magalhães^b,
Marianne Rodrigues Fernandes^a, João Augusto Nunes de Carvalho Junior^a,
André Salim Khayat^a, Sidney Santos^{a,b}, Paulo Pimentel de Assumpção^{a,d},
Ney Pereira Carneiro dos Santos^{a,b,*}

^a Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Rua dos Mundurucus, 4487, Belém, Pará CEP 66073-000, Brazil

^b Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Cidade Universitária Prof. José Silveira Netto, Belém, Pará 01 - CEP 66075-900, Brazil

^c Hospital Ophir Loyola, Departamento de Pediatria, Avenida Governador Magalhães Barata, 992, Belém, Pará CEP 66060-281, Brazil

^d Hospital Universitário João de Barros Barreto, Rua dos Mundurucus, 4487, Belém, Pará CEP 66073-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

ALL
Pediatrics
Polymorphisms
Susceptibility
Admixed

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common childhood neoplasia. Studies have shown that susceptibility to ALL may be modulated by genetic variables. Our study investigated 21 genetic variants in the susceptibility of the population of the Brazilian Amazon region to B-cell ALL. The variants of the genes *GGH*, *CEBPE*, *ARID5B*, *MTHFR* and *MTHFD1* were related to a protective effect against the development of ALL, whereas the variant of the gene *ATIC* was associated with a risk effect. The results suggest that genetic variants analyzed modulate the risk of developing ALL in the studied population.

1. Introduction

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common type of childhood hematopoietic neoplasia, and is responsible for 30% of all pediatric cancers [1,2], and is one of the principal causes of cancer deaths in children around the world [3]. The etiology of ALL is still poorly understood, although studies have shown that it may be provoked by a combination of environmental exposure and genetic susceptibility [4,5].

Recently, a number of studies of genome-wide association (GWAS) have found single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE*, *CDKN2A*, and *PIP4K2A* genes [6–10] that were related to the risk of developing ALL, specifically, the B cell lineage of the leukemia (B-cell ALL). While each of these variants is responsible for only a minor increase in the risk of developing ALL, they may have a cumulative influence on the genetic susceptibility to the disease [10]. In addition to their influence on genetic susceptibility to ALL, the prevalence of some of these variants may oscillate significantly among

patients of different ancestries, which may account for ethnic differences found in the incidence of the disease [10].

In addition to the polymorphisms discovered by the GWAS, one potential genetic pathway in the development of childhood ALL is folate biosynthesis. Folate is involved in the metabolism that plays an essential role in the synthesis, repair, and methylation of the DNA. Reduced ingestion of folate during pregnancy may result in breakage of the DNA molecule, as well as a reduction in repairs and abnormal methylation, which has led to the proposal of a link between polymorphisms in the genes involved in the biosynthesis of folate and the risk of developing ALL [11,12]. These polymorphisms may be associated with genes that codify the central regulator and the transport enzymes (for example, *MTHFD1*, *MTRR*, *MTHFR*, *SHMT1*, *GGH*, *SLCO1B1* and transporters of the ABC family) involved in the folate transport cycle, as well as the genes involved in the synthesis of purines, such as *AMPD1* and *ATIC* [11,13,14].

Most of the research that identified these genetic variants, either by GWAS or within the scope of the folate metabolism, has focused on

* Corresponding author at: Rua dos Mundurucus, 4487, Guamá, Belém, PA, Brazil.
E-mail address: npcsantos.ufpa@gmail.com (N.P.C. dos Santos).

<https://doi.org/10.1016/j.lrr.2019.100188>

Received 31 August 2019; Received in revised form 19 November 2019; Accepted 23 November 2019
Available online 27 November 2019

2213-0489/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ANEXO III - The Metabolization Profile of the CYP2D6 Gene in Amerindian Populations: A Review. (2020).



Review

The Metabolization Profile of the *CYP2D6* Gene in Amerindian Populations: A Review

Luciana P. C. Leitão ¹, Tatiane P. Souza ¹, Juliana C. G. Rodrigues ¹, Marianne R. Fernandes ¹, Sidney Santos ^{1,2,*} and Ney P. C. Santos ^{1,2,*}

¹ Oncology Research Center, Federal University of Pará, Belém, Pará 66073, Brazil;

colaresluciana@gmail.com (L.P.C.L.); xtatisouza@gmail.com (T.P.S.);

julianacgrodriques@gmail.com (J.C.G.R.); fernandesmr@yahoo.com.br (M.R.F.); sidneysantos@ufpa.br (S.S.)

² Laboratory of Human and Medical Genetics, Institute of Biological Science, Federal University of Pará, Belém, Pará 66077-830, Brazil

* Correspondence: npc Santos.ufpa@gmail.com

Received: 9 January 2020; Accepted: 14 February 2020; Published: 28 February 2020

Abstract: Background: the *CYP2D6* gene is clinically important and is known to have a number of variants. This gene has four distinct metabolization profiles that are determined by the different allelic forms present in the individual. The relative frequency of these profiles varies considerably among human populations around the world. Populations from more isolated regions, such as Native Americans, are still relatively poorly studied, however. Even so, recent advances in genotyping techniques and increasing interest in the study of these populations has led to a progressive increase in publication rates. Given this, the review presented here compiled the principal papers published on the *CYP2D6* gene in Amerindian populations to determine the metabolic profile of this group. Methods: a systematic literature review was conducted in three scientific publication platforms (Google Scholar, Science Direct, and Pubmed). The search was run using the keywords “*CYP2D6* Amerindians” and “*CYP2D6* native Americans”. Results: a total of 13 original papers met the inclusion criteria established for this study. All the papers presented frequencies of the different *CYP2D6* alleles in Amerindian populations. Seven of the papers focused specifically on Amerindian populations from Mexico, while the others included populations from Argentina, Chile, Costa Rica, Mexico, Paraguay, Peru, and the United States. The results of the papers reviewed here showed that the extensive metabolization profile was the most prevalent in all Amerindian populations studied to date, followed by the intermediate, slow, and ultra-rapid, in that order. Conclusion: the metabolization profiles of the Amerindian populations reviewed in the present study do not diverge in any major way from those of other populations from around the world. Given the paucity of the data available on Amerindian populations, further research is required to better characterize the metabolization profile of these populations to ensure the development of adequate therapeutic strategies.

Keywords: Amerindians; *CYP2D6*; phenotype; genetic polymorphisms; metabolization profile; Native Americans

1. Introduction

1.1. Rationale

The cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) is a member of the cytochrome P450 gene family, a group of enzymes that is responsible for phase I metabolism and the elimination of a variety of endogenous substrates and a diverse array of drugs [1]. The *CYP2D6* gene is the most frequently studied member

ANEXO IV - Parecer do comitê de ética e pesquisa

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA
EM ONCOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO DE GENOMA AMPLO (GWAS) NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA EM PACIENTES DA REGIÃO NORTE DO BRASIL

Pesquisador: Ney Pereira Carneiro dos Santos

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 11433019.5.0000.5634

Instituição Proponente: Instituto de Ciencias Biológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.419.333

Apresentação do Projeto:

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é o tipo de câncer que mais acomete crianças em todo o mundo, representando 75% das leucemias agudas e aproximadamente 35% de todas as neoplasias malignas na infância. Apesar do tratamento gerar taxas de cura de até 90%, cerca de 20% dos pacientes sofrem com toxicidades graves e podem evoluir para óbito em países desenvolvidos. Em contrapartida, a porcentagem de toxicidade grave em pacientes com LLA em populações altamente miscigenadas, como na Região Norte do Brasil, pode chegar em até 70%. Os SNPs são a fonte mais comum de variação genética dentro do genoma humano e podem alterar a função normal de genes envolvidos no risco de desenvolvimento da LLA, na modificação de resposta e metabolização de fármacos empregados no tratamento, podendo contribuir para o surgimento de efeitos adversos. Estudos atuais de GWAS são capazes de analisar simultaneamente milhões de SNPs em amostras de alguns milhares de indivíduos. Essa análise ajuda a identificar centenas de associações entre variantes genéticas comuns com mais de 80 doenças ou

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON
Bairro: GUAMA **CEP:** 66.073-005
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)98107-0858 **E-mail:** cep.npo@gmail.com

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA
EM ONCOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 3.419.333

traços. Com base nessas informações, o objetivo é desenvolver e investigar um painel de genoma amplo (GWAS) com marcadores moleculares indicativos de susceptibilidade e conduta terapêutica em pacientes pediátricos portadores de LLA. Serão incluídos 300 pacientes com LLA compondo o grupo caso e 300 indivíduos sem LLA, representando o grupo controle. A genotipagem será realizada através da plataforma Illumina. Serão feitas análises de associação buscando potenciais polimorfismos genéticos relacionados a predisposição e falha terapêutica a LLA. Todas as análises estatísticas serão realizadas utilizando programa estatístico SPSS v.25.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Por fim, a identificação de marcadores moleculares que representem risco de ocorrência de LLA ou associações com características clínicas ou epidemiológicas pode favorecer o desenvolvimento de condutas personalizadas, gerando dados a serem validados para a individualização do manejo clínico, que poderá beneficiar diversos pacientes futuramente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver e investigar um painel de genoma amplo (GWAS) com marcadores moleculares indicativos de susceptibilidade e conduta terapêutica em pacientes pediátricos portadores de LLA da região Norte do Brasil.

Objetivo Secundário:

- a) Investigar aproximadamente 120 mil SNPs em indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda e em um grupo controle representativo da população brasileira, sem leucemia.
- b) Identificar polimorfismos associados com a susceptibilidade à LLA na população investigada.
- c) Identificar as frequências de SNPs em farmacogenes ligados a possíveis efeitos tóxicos e resposta terapêutica a fármacos empregados no tratamento da LLA.
- d) Investigar possíveis associações entre os biomarcadores de farmacogenômica e reações adversas/toxicidade e resposta ao tratamento quimioterápico, nos pacientes com LLA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos significativos para a saúde ao participar do estudo. A amostra de sangue será

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON
Bairro: GUAMA **CEP:** 66.073-005
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)98107-0858 **E-mail:** cep.npo@gmail.com

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA
EM ONCOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 3.419.333

coletada por uma equipe treinada, podendo haver discreta dor e ocorrência de um pequeno hematoma em consequência da punção venosa. O estudo não se destina a administrar tratamento para qualquer condição médica. A participação não irá interferir com os tratamentos recomendados pelo médico, assim como opção de não participar, ou retirar-se do estudo, não acarretará em qualquer prejuízo ao paciente. Todas as informações pessoais coletadas como parte do estudo serão mantidas em sigilo e todas as determinações legais serão respeitadas.

Benefícios:

A identificação de marcadores moleculares que representem risco de ocorrência de LLA ou associações com características clínicas ou epidemiológicas pode favorecer o desenvolvimento de condutas personalizadas, gerando dados a serem validados para a individualização do manejo clínico, que poderá beneficiar diversos pacientes futuramente. O emprego de biomarcadores para melhor rastreio e diagnóstico precoce reduzindo riscos com tratamento e complicações à indivíduos em risco otimizará a aplicação de recursos públicos do SUS. O conhecimento das frequências polimórficas dos fármacogenes em uma população miscigenada brasileira permitirá o uso seletivo de medicamentos e doses, ajustados a cada indivíduo, reduzindo a ocorrência de efeitos adversos e possibilitando tratamentos personalizados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa intitulada INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO DE GENOMA AMPLO (GWAS) NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA EM PACIENTES DA REGIÃO NORTE DO BRASIL é muito importante para o prognóstico e tratamento adequado e mais preciso da doença, visto que irá favorecer uma linha de tratamento mais objetiva, eficaz e personalizada, atuando de forma mais precisa e poderá evitar diversas toxicidades do tratamento ao usuário.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisa intitulada INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO DE GENOMA AMPLO (GWAS) NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA EM PACIENTES DA REGIÃO NORTE DO BRASIL apresentou e cumpriu todos os requisitos referente aos termos de apresentação obrigatória, assim como documentos necessários para os menores de idade (TALE) e para seus devidos responsáveis (TCLE), buscando sempre esclarecer de forma bem clara e detalhada, além disso buscou sempre deixar o contato dos

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON
Bairro: GUAMA **CEP:** 66.073-005
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)98107-0858 **E-mail:** cep.npo@gmail.com

**UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA
EM ONCOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO**



Continuação do Parecer: 3.419.333

pesquisadores responsáveis nas documentação caso necessário, assim como o endereço do local da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO DE GENOMA AMPLO (GWAS) NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA EM PACIENTES DA REGIÃO NORTE DO BRASIL foi detalhada de forma clara e objetiva, apresentando todos os termos necessários para a análise devida deste CEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1320576.pdf	01/04/2019 14:28:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto detalhado brochura.pdf	01/04/2019 14:23:54	Ney Pereira Carneiro dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	01/04/2019 14:22:45	Ney Pereira Carneiro dos Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	instituicao participante.pdf	01/04/2019 13:54:51	Ney Pereira Carneiro dos Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo de compromisso.pdf	01/04/2019 13:53:51	Ney Pereira Carneiro dos Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao infraestrutura.pdf	01/04/2019 13:53:16	Ney Pereira Carneiro dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_consentimento_livre_esclarecido.docx	01/04/2019 09:44:43	Ney Pereira Carneiro dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_assentimento_livre_esclarecido.docx	01/04/2019 09:44:23	Ney Pereira Carneiro dos Santos	Aceito
Brochura Pesquisa	projeto_IIa_brochura.docx	28/03/2019 00:33:43	Ney Pereira Carneiro dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON
Bairro: GUAMA **CEP:** 66.073-005
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)98107-0858 **E-mail:** cep.npo@gmail.com

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA
EM ONCOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 3.419.333

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 27 de Junho de 2019

Assinado por:
Bruna Cláudia Meireles Khayat
(Coordenador(a))

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON
Bairro: GUAMA **CEP:** 66.073-005
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)98107-0858 **E-mail:** cep.npo@gmail.com