

MARA SOFIA AIRES FERNANDES

Polimorfismos genéticos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* e a sua influência no *outcome* clínico de indivíduos submetidos a Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Oncologia – Especialização em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Categoria – Professor Associado Convidado com Agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Instituto Português de Oncologia do Porto

Co-orientadora - Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

Afiliação – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Instituto Português de Oncologia do Porto

Informação Técnica

TÍTULO:

Polimorfismos genéticos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* e a sua influência no *outcome* clínico de indivíduos submetidos a Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Oncologia – Especialização em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

AUTOR: Mara Sofia Aires Fernandes

DATA: Setembro de 2014

EDITOR: Mara Sofia Aires Fernandes

MORADA: Avenida Tondela, nº 361

LOCALIDADE: Peso da Régua

CÓDIGO POSTAL: 5050-059 Peso da Régua

CORREIO ELETRÓNICO: marasafernandes@gmail.com

1ª EDIÇÃO: Setembro de 2014

Aos meus pais e irmãos

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is to not stop questioning.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao concretizar esta etapa do meu percurso académico, não posso deixar de agradecer a todos os que contribuíram para o alcançar deste meu objetivo académico e científico.

Deste modo, gostaria de agradecer à comissão de Coordenação do Mestrado em Oncologia, sob a pessoa da Professora Doutora Berta Silva, a oportunidade de ingressar neste mestrado e de enriquecer os meus conhecimentos científicos na área da oncologia.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, meu orientador, por me ter recebido no seu grupo de investigação, oferecendo-me a oportunidade de desenvolver este projeto. Obrigada pela sua disponibilidade, confiança, motivação e pelas suas palavras sábias em momentos determinantes deste percurso...

À Doutora Ana Luísa Teixeira, minha coorientadora, pela partilha do seu conhecimento e pela confiança depositada em mim. Um grande obrigado pelo constante apoio, dedicação, paciência e sobretudo pela amizade. Um obrigado do tamanho do mundo da tua "Marada"...

Ao grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, em especial à Dra. Mónica Gomes, à Dra. Joana Assis e ao Dr. Augusto Nogueira, por me fazerem sentir integrada no grupo e por estarem sempre disponíveis, por todas as conversas mais ou menos sérias mas sobretudo por todas as gargalhadas partilhadas ao longo deste ano. Obrigado por tornarem este ano de trabalho mais divertido.

Às minhas amigas e companheiras Francisca Dias, Isabel Paiva, Romina Silva e Patrícia Figueiredo que me acompanharam desde o primeiro dia, por todos os momentos de cumplicidade e partilha e por todas as gargalhadas. Obrigado por me fazerem rir mesmo nos momentos complicados e pela paciência que tiveram para aturarem a mim e aos meus desvaneios. Um muito obrigado especial à Francisca Dias, por facilitar bastante a minha integração no grupo, pela paciência para me ensinar e ajudar ao longo do meu trabalho mas sobretudo pela amizade e por estares sempre pronta para me acompanhares nas nossas grandes discussões sobre as nossas séries e filmes. A vocês um obrigado do tamanho do mundo por caminharem comigo...

A todos os meus amigos de CBM, de Aveiro, que apesar de ser cada vez mais difícil estarmos todos juntos, quando nos encontramos parece que nada mudou.

Obrigado por todos os momentos que partilhamos, por todas as gargalhadas e palhaçadas.

Aos meus pais, os meus pilares, os verdadeiros incentivadores das aventuras da minha vida, muito obrigada por todo o apoio incondicional, por toda a paciência, confiança, entrega, carinho e amor... por tudo aquilo que me ajudaram a construir e a concretizar, sem eles definitivamente nada disto era possível. OBRIGADA!

Ao meu maninho, o futuro Dr. André Fernandes, o meu orgulho. Obrigado por estares sempre ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida. À minha irmã Marisa Fernandes, que mesmo longe está sempre presente no meu pensamento e coração. Obrigado por tudo, maninhos!

Aos meus tios, Arnaldo e Odete por acreditarem em mim e pelo apoio e motivação, sentindo os meus objetivos e o meu entusiasmo como seus também.

Aos meus avós, que partiram cedo de mais antes de verem concretizada esta etapa da minha vida.

A todos o meu sincero muito obrigado.

A

Ago2	<i>Argonaute-2</i>
AGC	Famílias das proteínas cinases A, G, e C
AKT	<i>Protein kinase B</i>
ATP/AMP	Rácio Adenosina Trifosfato/Adenosina Monofosfato

C

cDNA	DNA complementar
CMV	Citomegalovírus

D

DEPTOR	<i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8 protein</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico

E

eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E (fator de iniciação eucariótico 4E)
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i> , uma metiltransferase
4E-BP1	<i>Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1</i>

F

FACT	<i>FAT-carboxyl terminal</i>
FAT	FRAP-ATM-TTRAP
FRB	<i>FKBP-rapamycin-binding</i>

G

GAP	GTPase
G-CSF	Fator de estimulação de colónias de granulócitos
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphatephosphate</i>
GvHD	Doença do enxerto contra o hospedeiro

H

HBV	Vírus da hepatite B
-----	---------------------

HCMV	Citomegalovírus Humano
HIF1 α	Fator induzido pela hipoxia 1 α
HLA	Antigénio dos Leucócitos Humano
HSC	Células estaminais hematopoiéticas
HSCT	Transplante de células estaminais hematopoiéticas
HSV	Vírus herpes <i>simplex</i>

I

IgG2	Imunoglobulinas
IL23R	Recetor da interleucina 23

K

kDa	Dalton
-----	--------

L

LPS	Lipopolissacarídeos
LT-HSCs	<i>Long-term hematopoietic stem cells</i>

M

MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
microRNA	miRNA
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
MKP-1	<i>MAPK phosphatase-1</i>
mL	Mililitros
mLST8	<i>Mammalian lethal with sec-13 protein 8</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mSin1	<i>Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1</i>
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1	Complexo 1 de mTOR
mTORC2	Complexo 2 de mTOR

N

nm	Nanométros
----	------------

P

<i>P</i>	Probabilidade
PACT	<i>Protein activator of PKR</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PGC1 α	Coativador 1 α de PPAR- γ
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PKC- α	Proteína cinase de C- α
pp	Fosfoproteína
PPAR- γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRAS40	Substrato de AKT rico em prolina de 40 kDa
pré-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primário
protor1/2	Proteína observada com o RICTOR-1 e 2
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina

R

RAPTOR	Proteína reguladora de mTOR
RCL1	<i>RNA terminal phosphate cyclase-like 1</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RICTOR	Companheiro de mTOR insensível à rapamicina
RTKs	Recetores de tirosina cinase

S

S6K1	Cinase 1 S6
SGK1	<i>Serum and glucocorticoid-induced kinase 1</i>
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SNPs	<i>Single-Nucleotide-Polymorphisms</i>
ST-HSCs	<i>Short-term hematopoietic stem cells</i>

T

TRBP	<i>Tar RNA binding protein</i>
TSC1/2	<i>Tuberous sclerosis 1/2</i>

U

μL	Microlitros
UTR	<i>Untranslated region</i>

W

WHO	<i>World Health Organization</i>
-----	----------------------------------

X

XPO-5	Exportina-5
-------	-------------

Y

YY1	Fator de transcrição Ying-Yang 1
-----	----------------------------------

Resumo	19
Abstract	23
1. Introdução	27
1.1. O Cancro: Conceitos Gerais	29
1.2. Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas	32
1.2.1. Citomegalovírus humano	33
1.2.2. Células estaminais hematopoiéticas	35
1.3. mTOR: a Via de Sinalização PI3K-AKT-mTOR	39
1.4. Papel da Via PI3K-AKT-mTOR na quiescência das HSCs	42
1.5. microRNAs	45
1.6. miRNA-101 e a via mTOR	47
1.7. Polimorfismos Genéticos no <i>miR-101</i>	49
2. Objetivos	51
2.1. Objetivos Gerais	53
2.2. Objetivos Específicos	53
3. Material e Métodos	55
3.1. População	57
3.2. Procedimentos Laboratoriais	59
3.2.1. Extração de DNA genómico	59
3.2.2. Genotipagem dos polimorfismos	59
3.2.3. Extração de miRNA	61
3.2.4. Quantificação do miRNA	62
3.3. Análise Estatística	63
4. Resultados	65
4.1. Frequência dos polimorfismos <i>miR-101 rs7536540</i> e <i>miR-101 rs12375841</i> nos indivíduos submetidos a HSCT e na população controlo	67

4.2. Influência dos polimorfismos <i>miR-101 rs7536540</i> e <i>miR-101 rs12375841</i> na sobrevivência global após HSCT	70
4.3. Influência dos polimorfismos <i>miR-101 rs7536540</i> e <i>miR-101 rs12375841</i> na sobrevivência global a 1 ano após HSCT	71
4.4. Influência da infecção por HCMV na sobrevivência global de indivíduos submetidos a HSCT	72
4.5. Influência dos polimorfismos <i>miR-101 rs7536540</i> e <i>miR-101 rs12375841</i> na biodisponibilidade do <i>miR-101</i>	74
5. Discussão	77
5.1. Influência dos polimorfismos <i>miR-101 rs7536540/miR-101 rs12375841</i> e da infecção por HCMV na sobrevivência global após HSCT	81
5.2. Influência dos polimorfismos <i>miR-101 rs7536540/miR-101 rs12375841</i> e da infecção por HCMV na sobrevivência global a 1 ano após HSCT	84
6. Conclusão e Perspetivas Futuras	87
7. Bibliografia	91

Figura 1- Estimativa do número de novos casos de cancro para o ano de 2020 (GLOBOCAN 2012, IARC).....	30
Figura 2 - Esquema de um virião de HCMV. O virião HCMV é constituído por um envelope exterior membranosos cravejado com complexos de glicoproteínas essenciais para a entrada viral e fusão da membrana, uma camada de tegumento de fosfoproteínas e uma cápside que encapsula ~250 kb de DNA de cadeia dupla.	34
Figura 3 - Organização hierárquica das diferentes populações de progenitores de acordo com o seu potencial de autorrenovação.	36
Figura 4 - Esquema do Ciclo Celular e da reversibilidade do estado G0. As células somáticas têm a capacidade de entrar em estados G0 reversíveis (quiescência) ou irreversíveis (senescência e diferenciação) a partir da fase G1 do ciclo celular.	37
Figura 5 - Esquema da cinase mTOR, dos componentes dos complexos mTORC1 e mTORC2 e dos locais de interação entre eles (adaptado de	40
Figura 6 - Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR.	41
Figura 7 - Elementos <i>downstream</i> da via de mTOR.....	43
Figura 8 - Influência da via PI3K/AKT/mTOR no destino das HSCs.	44
Figura 9 - Mecanismo de biogénese e processamento de miRNAs.	47
Figura 10 - Via mTOR regulada pelo miR-101.	49
Figura 11 - Representação de um <i>Real-time PCR</i> para o polimorfismo <i>rs12375841</i> . (azul: homocigóticos T; vermelho: homocigóticos C; verde: heterocigóticos; cinzento: controlos negativos).....	61
Figura 12 - Curvas de amplificação da expressão relativa do miRNA.	62
Figura 13 - Gráfico relativo às frequências do polimorfismo <i>miR-101 rs7536540</i> no grupo de indivíduos submetidos a HSCT.....	67
Figura 14 - Gráfico relativo às frequências do polimorfismo <i>miR-101 rs12375841</i> no grupo de indivíduos submetidos a HSCT.....	68
Figura 15 - Curvas de Sobrevivência global de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>Log Rank</i> de indivíduos submetidos a HSCT: influência dos polimorfismos A) <i>miR-101 rs7536540</i> e B) <i>miR-101 rs12375841</i>	70

Figura 16 - Curvas de Sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>Log Rank</i> relativas à sobrevivência global a 1 ano de indivíduos submetidos a HSCT: influência dos polimorfismos A) <i>miR-101 rs7536540</i> e B) <i>miR-101 rs12375841</i>	71
Figura 17 - Curvas de Sobrevivência global de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>Log Rank</i> de indivíduos submetidos a HSCT: influência da infecção por HCMV	72
Figura 18 - Curvas de Sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>Log Rank</i> relativas à sobrevivência global a 1 ano de indivíduos submetidos a HSCT: influência da infecção por HCMV.....	73
Figura 19 - Níveis de expressão relativa do miR-101 em indivíduos do grupo controle: influência do polimorfismo <i>miR-101 rs7536540</i>	74
Figura 20 - Níveis de expressão relativa do miR-101 em indivíduos do grupo controle: influência do polimorfismo <i>miR-101 rs12375841</i> (* $P<0,050$).....	75
Figura 21 - Modelo de <i>follow-up</i> de indivíduos submetidos a HSCT, proposto com base nos resultados obtidos no presente estudo.....	85

Tabela 1 - Doenças comumente tratadas com HSCT	31
Tabela 2 - Frequência genômica dos polimorfismos <i>miR-101 rs7536540</i> e <i>miR-101 rs12375841</i> nas populações Europeia, Asiática e Africana (Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/).	50
Tabela 3 - Características clínico-patológicas do grupo de casos submetidos a HSCT e características gerais do grupo controle.	58
Tabela 4 - Frequências genotípicas do polimorfismo <i>miR-101 rs7536540</i> no grupo de indivíduos controle.....	68
Tabela 5 - Frequências genotípicas do polimorfismo <i>miR-101 rs12375841</i> no grupo de indivíduos controle.....	69



RESUMO

O transplante de células estaminais hematopoiéticas (HSCT) constituiu um progresso marcante ao nível do tratamento das doenças hematológicas. O HSCT consiste na substituição do sistema hematopoiético de forma a restabelecer a função hematopoiética em doentes com comprometimento deste sistema e/ou do sistema imune. Os indivíduos submetidos a HSCT, em consequência do seu estado imunossuprimido, apresentam uma maior suscetibilidade a infeções, destacando-se as infeções por citomegalovírus humano (HCMV).

As células estaminais hematopoiéticas (HSC) caracterizam-se pela sua capacidade de multipotência e de autorrenovação, mantendo um estado de quiescência mas com a capacidade de entrar no ciclo celular em resposta a estímulos externos. O equilíbrio entre a quiescência e a proliferação é firmemente regulado por mecanismos intrínsecos das HSCs, destacando-se a via de sinalização celular PI3K-AKT-mTOR. O desequilíbrio da homeostasia desta via de sinalização tem sido associado à transição do estado de quiescência para a entrada em ciclo celular destas células, o que pode levar ao esgotamento do *pool* de HSCs. Esta desregulação pode ser consequência da ocorrência de polimorfismos genéticos funcionais no microRNA-101 (miR-101), que é responsável pela inibição do mRNA de mTOR. Os miRNAs são importantes reguladores da expressão de genes envolvidos em processos celulares fundamentais tais como desenvolvimento, diferenciação, proliferação, sobrevivência e morte celular.

Deste modo, foram realizados estudos com o objetivo de avaliar a influência de polimorfismos genéticos em genes do miR-101 na sobrevivência de indivíduos submetidos a HSCT, assim como avaliar a sua consequência funcional nos níveis de expressão em circulação do miR-101.

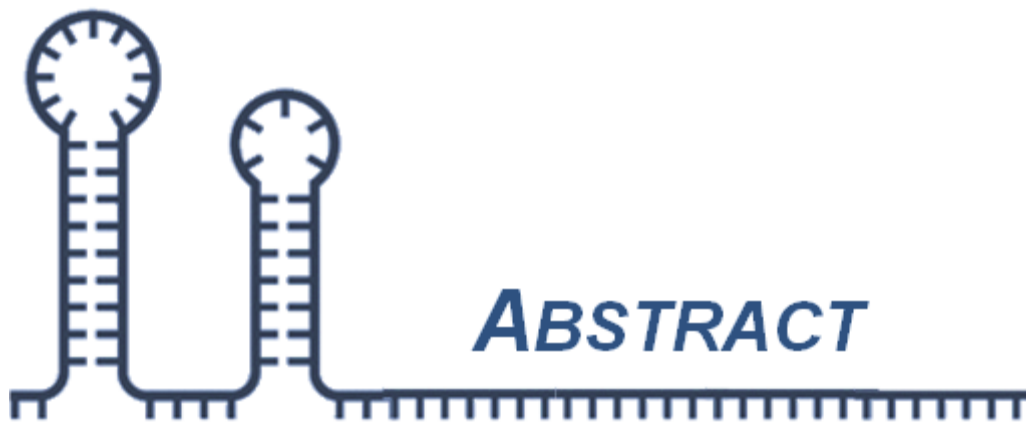
Verificou-se que os polimorfismos genéticos englobados no estudo influenciam os níveis de expressão do miR-101. Os indivíduos portadores do genótipo miR-101- CC (*rs12375841*) apresentam níveis de expressão 2,4 vezes aumentados deste miRNA comparativamente aos indivíduos portadores dos genótipos TT/CT ($P=0,040$). Observamos ainda uma tendência para níveis diminuídos do miR-101 associados ao genótipo CC quando ao polimorfismo *miR-101 rs7536540*.

De facto, os indivíduos portadores dos genótipos miR-101-TC/CC (*rs12375841*) apresentam uma sobrevivência global significativamente superior comparativamente aos indivíduos homozigóticos TT (47,1 vs. 41,4 meses, $P=0,011$). Contudo, não observamos qualquer associação estatisticamente significativa entre os genótipos do polimorfismo *miR-101 rs7536540* e a sobrevivência global.

Verificou-se que a infecção ativa por HCMV tem particular influência na sobrevivência global a um ano. Os indivíduos com infecção ativa por HCMV apresentam uma sobrevivência inferior, estatisticamente significativa, comparativamente aos indivíduos HCMV negativos (9,9 vs. 10,7 meses, $P=0,020$).

Em suma, propomos um modelo integrativo de *follow-up* baseado na infecção por HCMV e no *background* genético do indivíduo. Durante o primeiro ano após o transplante, o doente deverá ser monitorizado regularmente para a infecção por HCMV, de forma a permitir uma intervenção terapêutica antecipada. A partir do sexto mês após o transplante, a definição do *background* genético individual permitirá a identificação de subgrupos de risco que poderão beneficiar de terapias dirigidas.

A definição de um modelo integrativo constitui uma estratégia útil para um *follow-up* dos doentes mais eficiente proporcionando assim uma medicina mais personalizada no tratamento de neoplasias hematológicas.



Hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) is considered a remarkable improvement in the treatment of hematological malignancies. HSCT involves the replacement of the hematopoietic system in order to restore hematopoietic function in patients with this system and/or immune system compromised. Due to the immunosuppression, the patient has an increased susceptibility to infections, laying emphasis on infections by human cytomegalovirus (HCMV).

Hematopoietic stem cells (HSC) are characterized by their properties of multipotency and self-renewal, maintaining a quiescent state but with the ability to enter the cell cycle in response to external stimuli. The balance between quiescence and proliferation of stem cells is tightly regulated by cell-intrinsic regulatory mechanisms, giving prominence to the PI3K-AKT-mTOR pathway.

The disruption of homeostasis of this cell signaling pathway has been associated with the transition from a quiescent state into cell cycle, which may lead to depletion of HSCs pool. This deregulation may be due to functional genetic polymorphisms in miR-101 (miR-101), which is responsible for the inhibition of mTOR mRNA. miRNAs are key regulators of the expression of genes involved in essential cellular processes such as development, differentiation, proliferation, survival and cell death.

Therefore, investigation studies were performed with the purpose of evaluating the influence of miR-101 genetic polymorphisms in the overall survival of patients submitted to HSCT, as well as assessing their functional consequence in the expression levels of circulating miR-101.

The results suggest that the genetic polymorphisms studied interfere with the expression levels of miR-101. Individuals carrying miR-101-CC (*rs12375841*) genotype present a 2.4 fold increase of this miRNA compared to carriers of TT/CT genotypes ($P=0.040$). We also observed a trend toward decreased levels of miR-101 associated with the miR-101-CC (*rs7536540*) genotype. In fact, individuals carrying miR-101-TC/CC (*rs12375841*) genotype show a significantly higher overall survival compared to TT homozygous individuals (47.1 vs. 41.4 months, $P=0.011$). Nevertheless, we found no significant association between the genotypes of *miR-101 rs7536540* polymorphism and the overall survival of patients undergoing HSCT.

Additionally, accordingly with the results, the active HCMV infection influences the one year overall survival of patients. Individuals with active HCMV infection have a significantly lower overall survival compared to HCMV-negative individuals (10.7 vs. 9.9 months, $P=0.020$).

To conclude, we propose an integrative model of patient follow-up based on HCMV infection and individual genetic background. During the first year after transplantation, the patient should be regularly monitored for HCMV infection, in order to allow an early therapeutic intervention. Starting on the sixth month after transplantation, the characterization of the individual genetic background will allow the identification of high risk subgroups that may benefit from targeted therapies.

The definition of an integrative model is a useful strategy for a more effective follow-up of patients submitted to HSCT, thus providing a more personalized medicine in the treatment of hematologic malignancies.



1. INTRODUÇÃO

1.1. O Cancro: Conceitos Gerais

O cancro pode ser caracterizado como uma doença genética envolvendo desregulações genómicas e epigenéticas que resultam na desregulação dos mecanismos homeostáticos [1]. O processo de carcinogénese é um fenómeno complexo, multifásico e multifactorial que culmina na aquisição de várias alterações celulares, o que resulta na desregulação de múltiplas vias de sinalização celular envolvidas em processos como a apoptose, a proliferação, a diferenciação e a migração celulares [2].

Estas alterações genéticas refletem-se no desenvolvimento de características fenotípicas que garantem às células tumorais a capacidade de invadir e metastizar, apresentando uma vantagem competitiva relativamente às células normais [3].

Os últimos avanços relativos à biologia do cancro permitiram determinar algumas das propriedades que diferenciam as células tumorais das células normais: a autossuficiência relativamente aos fatores de crescimento, a capacidade de evasão ao sistema imunológico e à apoptose, angiogénese, potencial replicativo ilimitado, promoção da inflamação, instabilidade genómica e mutações, desregulação energética, capacidade de invasão tecidual e metastização [2].

Nos últimos anos, o cancro tem-se revelado um problema crescente de saúde pública em todo o mundo, tornando-se numa das principais causas de morte em vários países. Estima-se que em 2020, em todo o mundo, o número de novos casos de cancro atinja aproximadamente os 17 milhões, e que a mortalidade seja de aproximadamente de 10 milhões (excluindo o cancro de pele não melanoma) (Figura 1) [4].

Nas mulheres, o cancro da mama continua a ser a neoplasia mais frequente correspondendo a 29% das neoplasias diagnosticadas e é responsável por cerca de 17% das mortes por cancro na Europa. No caso dos homens, a neoplasia mais frequente é o cancro da próstata representando cerca de 23% das neoplasias diagnosticadas e 10% das mortes por cancro [4].

Cumulativamente, tem-se verificado um aumento da incidência das neoplasias hematológicas em consequência da crescente incidência das doenças crónicas e de condições associadas a fatores de risco, como síndrome metabólico e inflamação crónica [5]. Na Europa, as neoplasias hematológicas correspondem a cerca de 25% das neoplasias diagnosticadas e são responsáveis por cerca 21% de mortes por cancro. Estima-se que em 2020 o número de novos casos seja de aproximadamente 250 mil casos [4].

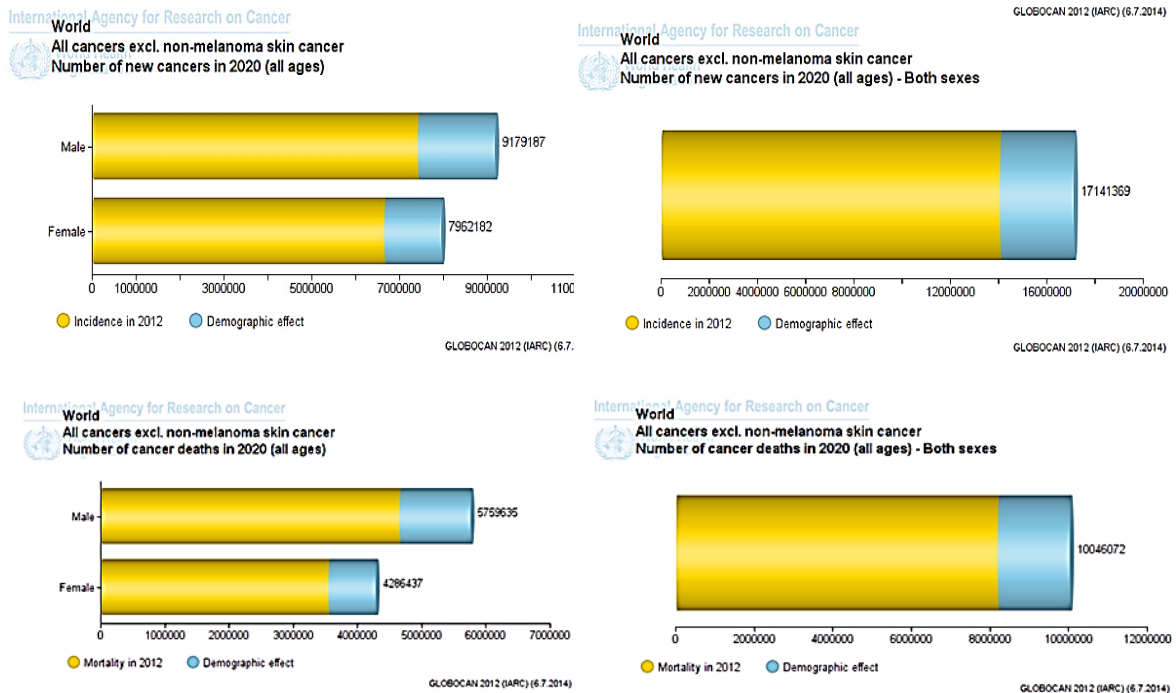


Figura 1- Estimativa do número de novos casos de cancro para o ano de 2020 (GLOBOCAN 2012, IARC).

As neoplasias hematológicas constituem um grupo heterogéneo de neoplasias que incluem cancros provenientes de órgãos hematopoiéticos primários adultos (por exemplo, medula óssea, sangue), como os mielomas e as leucemias, e os provenientes de órgãos linfóides secundários (por exemplo, nódulos linfáticos), como os linfomas [6].

Estas neoplasias do sistema sanguíneo resultam geralmente de eventos patogénicos que perturbam o equilíbrio homeostático entre o *turnover* das células hematopoiéticas maduras e a sua reposição pelas células estaminais hematopoiéticas e células progenitoras. Este fenómeno pode ser devido à desregulação da proliferação levando, conseqüentemente, ao aumento da razão células progenitoras/maduras, ou ainda devido à aquisição de características de autorrenovação por parte das células progenitoras, que normalmente não se autorrenovam [6].

Infelizmente, este grupo de doenças é normalmente crónico necessitando de repetidos ciclos de tratamento e encontra-se associado a mau prognóstico e a acentuada morbidade pós-tratamento [6].

O tratamento das neoplasias hematológicas depende da idade, do estado geral de saúde do doente e do tipo de neoplasia. Os esquemas de tratamento podem incluir combinações de quimioterapia, imunoterapia, radioterapia e o transplante de células

estaminais hematopoiéticas (HSCT – do inglês *Hematopoietic stem cell transplantation*) [7].

O transplante de células estaminais foi um desenvolvimento relevante para o tratamento das doenças hematológicas e algumas condições não hematológicas. A grande maioria dos casos de HSCT é associada a neoplasias hematopoiéticas como a leucemia mieloide aguda (32%), a leucemia linfoblástica aguda (16%), síndromes mielodisplásicas (16%) e linfoma não-Hodgkin, e uma pequena percentagem é associada ao tratamento de tumores sólidos (neuroblastoma ou sarcoma de Ewing - 1%) e doenças autoimunes (0,8%) (Tabela 1) [8].

Atualmente, o transplante de células estaminais hematopoiéticas oferece a melhor hipótese de cura para muitas das patologias já referidas comparativamente aos tratamentos alternativos existentes.

Tabela 1- Doenças comumente tratadas com HSCT

Doenças normalmente tratadas por HSCT	
Transplantes Autólogos	
Cancro	Mieloma Múltiplo Linfoma Não-Hodgkin Leucemia Mieloide Aguda Neuroblastoma Cancro do ovário Tumores das células germinais
Outras Doenças	Doenças Autoimunes Amiloidose
Transplantes Alogénicos	
Cancro	Leucemia Mieloide Aguda Leucemia Linfoblástica Aguda Leucemia mieloide crónica Síndromes Mielodisplásicas Doenças Mieloproliferativas Linfoma Não-Hodgkin Linfoma Hodgkin Leucemia Linfocítica Crónica Mieloma Múltiplo
Outras Doenças	Anemia Aplástica Hemoglobinúria noturna paroxismal Anemia de Fanconi Talassemia Imunodeficiência combinada severa Síndrome de Wiskott–Aldrich

1.2. Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas

O HSCT consiste na substituição do sistema hematopoiético, usando células estaminais provenientes do próprio doente (transplante autólogo) ou de outra pessoa (transplante alogénico), de forma a restabelecer a função hematopoiética em doentes com o sistema hematopoiético e imune comprometidos.

As células estaminais podem ser recolhidas a partir da medula óssea, do sangue periférico ou do sangue do cordão umbilical [8]. Devido ao facto das células estaminais da medula se separarem continuamente, entrarem na circulação sanguínea e por fim retornarem à medula, o sangue periférico é uma fonte conveniente de células estaminais hematopoiéticas. Para além disso, estudos recentes demonstraram que as células estaminais obtidas do sangue periférico desencadeiam uma reconstituição hematopoiética mais rápida comparativamente às células colhidas da medula [9]. A proteína de superfície celular CD34 foi identificada como marcador de uma subpopulação de células da medula com a capacidade de enxertar e originar várias células hematopoiéticas. Deste modo, a adição de um fator de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF) e de um antagonista do recetor CXCR4 (medeia adesão das células CD34⁺ à medula) permite aumentar a mobilização de células CD34⁺ da medula para o sangue [7, 9]. Este facto constituiu um avanço importante para os doentes que são submetidos a fortes pré-tratamentos e que não são capazes de mobilizar um número suficiente de HSCs [9].

O *outcome* clínico após HSCT foi melhorando significativamente durante as últimas décadas. O HSCT apresenta melhores resultados que os tratamentos alternativos, mas continua associado a acentuada morbidade e mortalidade. De facto, cerca de 40% dos doentes submetidos a transplante alogénico morrem de complicações relacionadas com o transplante [7].

Este procedimento continua a ter vários riscos associados como a toxicidade associada às altas doses de tratamento do regime preparatório (quimioterapia com/sem radioterapia) e o possível desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD, do inglês *graft-versus-host disease*) [10]. Inicialmente, o regime preparatório começou por ser mieloablativo, tendo como objetivo a erradicação e indução de imunossupressão que permitisse o enxerto em transplantes alogénicos [7, 11]. Nos últimos anos, associado a uma melhor compreensão da biologia do enxerto *versus* tumor foram desenvolvidos esquemas de regimes não-mieloablativos menos tóxicos. Comparativamente aos regimes mieloablativos, estes novos regimes são primariamente

imunossupressores e dependem da imunidade mediada pelo enxerto para erradicar o cancro [12]. Por essa razão, o HSCT é acompanhado por um regime imunossupressor, constituído por combinação de quimioterápicos associado ou não a irradiação total do corpo, de forma a evitar a rejeição do enxerto [10, 11].

Os recetores de transplante, devido ao seu estado imunocomprometido, apresentam uma maior suscetibilidade a infeções bacterianas, fúngicas e virais, destacando-se as infeções pelo citomegalovírus (CMV), que contribuem significativamente para a morbilidade e mortalidade em indivíduos submetidos a HSCT [8].

Atualmente, o HSCT oferece a melhor hipótese de cura para diversas doenças hematopoiéticas e não hematopoiéticas. A maior barreira para o doente ter acesso ao HSCT alogénico é a necessidade de se encontrar um dador compatível relativamente ao antígeno dos leucócitos humano (HLA). Os recentes desenvolvimentos nesta área irão permitir aumentar o *stock* de fontes de HSCs para transplante para que mais pessoas tenham acesso a este tratamento. Para além disso, permitirão determinar os melhores regimes ablativos para condições específicas e melhorar a eficácia dos regimes de intensidade reduzida. Portanto, uma melhor compreensão dos reguladores moleculares envolvidos em vias celulares das HSCs e de polimorfismos genéticos que poderão alterar essas vias pode ajudar a prever e a melhorar o *outcome* clínico.

1.2.1. Citomegalovírus humano

Os indivíduos recetores de transplante, devido ao seu estado imunocomprometido, apresentam uma maior suscetibilidade a infeções bacterianas, fúngicas e virais, eventos que contribuem significativamente para a morbilidade e mortalidade associadas ao HSCT. Na fase inicial pré-enxerto, durante a aplasia da medula óssea, predominam as infeções bacterianas, enquanto que nas fases inicial e tardia pós-excerto (30-100 dias e >100 dias, respetivamente) predominam as infeções fúngicas e virais, destacando-se no último caso as infeções por vírus da família herpes, mais especificamente o CMV [8, 13, 14].

O citomegalovírus humano (HCMV) é um membro da subfamília *Betaherpesvirinae* da família *Herpesviridae* que infecta a maioria da população até à

idade adulta – até aos 40 anos cerca de 50 a 85% dos adultos são infetados pelo HCMV (Figura 2) [15].

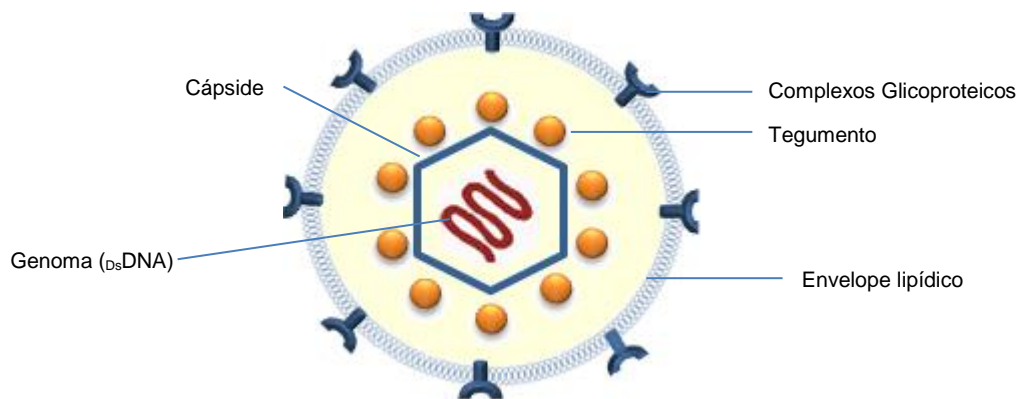


Figura 2 - Esquema de um virião de HCMV. O virião HCMV é constituído por um envelope exterior membranoso cravejado com complexos de glicoproteínas essenciais para a entrada viral e fusão da membrana, uma camada de tegumento de fosoproteínas e uma cápside que encapsula ~250 kb de DNA de cadeia dupla.

Indivíduos imunocompetentes, capazes de desenvolver uma forte resposta imunológica, geralmente não apresentam sintomas da infeção. Contudo, o HCMV desempenha um importante papel patogénico em casos de mulheres seronegativas que sofrem infeção primária durante a gravidez. Neste caso, o HCMV pode ser transmitido da mãe para o feto, em aproximadamente 32% dos casos, e cerca de 12,7% dos recém-nascidos infetados desenvolvem sintomas ou problemas a nível do desenvolvimento neurológico [16, 17]. No caso de indivíduos cujo sistema imunológico se encontra comprometido (de que são exemplos o Síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e os transplantados), estes desenvolvem sintomas como febre, leucopenia, mal-estar, hepatite, pneumonia, doença gastrointestinal, encefalopatia e/ou retinite [15, 18].

O HCMV é restrito aos seres humanos relativamente ao hospedeiro, mas dentro de um hospedeiro tem a capacidade de infetar virtualmente qualquer tipo de tecido, devido a uma excepcionalmente ampla gama de tipos de células-alvo [17]. Quando as infeções primárias ocorrem por transmissão oral, as primeiras células infetadas são as células epiteliais da rinofaringe, ou o epitélio do trato genital em transmissões por contato sexual. Caso a infeção ocorra por transfusões sanguíneas, as células endoteliais vasculares são as primeiras infetadas [17]. Aquando da infeção, os leucócitos são

recrutados para os sítios de infecção primária, sendo nesta fase infetados, iniciando assim a disseminação hematológica. [17].

Após a disseminação hematológica, o HCMV pode ser detetado no sangue através da medição da antigenemia com a deteção da fosfoproteína pp65 ou por deteção do DNA viral por PCR no núcleo dos leucócitos polimorfonucleares e monócitos do sangue periférico [17, 19].

O HCMV estabelece um período de latência e persiste, replicando-se mesmo na presença de um sistema imune eficiente através de várias estratégias de evasão imune [20].

Devido ao comprometimento da imunidade mediada por células verificada em doentes submetidos a HSCT, é frequente a reativação do HCMV contribuindo para a morbidade dos doentes. A gravidade da infecção está correlacionada com o grau de imuno-comprometimento do doente [21].

Diversas investigações estão em curso com o objetivo de desenvolver novas estratégias de prevenção e de tratamento das infeções oportunistas de forma a evitar reativações e melhorar o *outcome* do transplante.

1.2.2. Células estaminais hematopoiéticas

O conceito de “células estaminais” foi proposto com base no trabalho pioneiro de James Till e Ernest McCulloch sobre regeneração do sistema hematopoiético *in vivo* em ratos transplantados com medula óssea. Till e McCulloch observaram que uma pequena subpopulação de células da medula óssea era capaz de gerar vários tipos de células mielo-eritróides e tinha a capacidade de se auto-replicar. Estas observações deram origem às duas propriedades que classificam as células estaminais – autorrenovação e diferenciação [22]. Portanto, as células estaminais hematopoiéticas (HSC, do inglês *hematopoietic stem cell*) são células estaminais adultas com a capacidade de se diferenciarem em qualquer célula sanguínea funcional (multipotência) e de, simultaneamente originar HSCs filhas idênticas sem diferenciação (autorrenovação) [23].

Foi proposto que a capacidade de autorrenovação das HSCs deve-se a uma divisão celular assimétrica, em que uma HSC pode dar origem a duas células-filhas distintas, uma que mantém a identidade de célula estaminal e outra que se diferencia [24].

Portanto, a manutenção do *pool* de células estaminais depende do equilíbrio entre a autorrenovação e diferenciação celular [25]. Quando a taxa de autorrenovação é superior à taxa de diferenciação, a população de células estaminais expande-se, e quando a taxa de autorrenovação é menor do que a taxa de diferenciação, a população diminui devido à exaustão [25].

Verificou-se que a composição celular da medula óssea é heterogênea, sendo possível organizar hierarquicamente as diferentes populações de progenitores de acordo com o seu potencial de autorrenovação e diferenciação [26]. As *Long-term* HSCs (LT-HSCs) têm a capacidade de se autorrenovarem indefinidamente garantindo a homeostasia das células sanguíneas que o indivíduo requer ao longo da vida. As LT-HSCs podem dar origem às *short-term* HSCs (ST-HSCs), caracterizadas pela extensa capacidade de proliferação e diferenciação e contribuem para a formação de progenitores multipotentes. Por último, as células progenitoras multipotentes são células que perderam capacidade de autorrenovação das HSCs (Figura 3) [27]. Comparativamente às LT-HSCs, as ST-HSCs e as células progenitoras multipotentes, quando transplantadas, têm a capacidade de manter a hematopoiese durante um curto período de tempo devido à rápida exaustão das células [27].

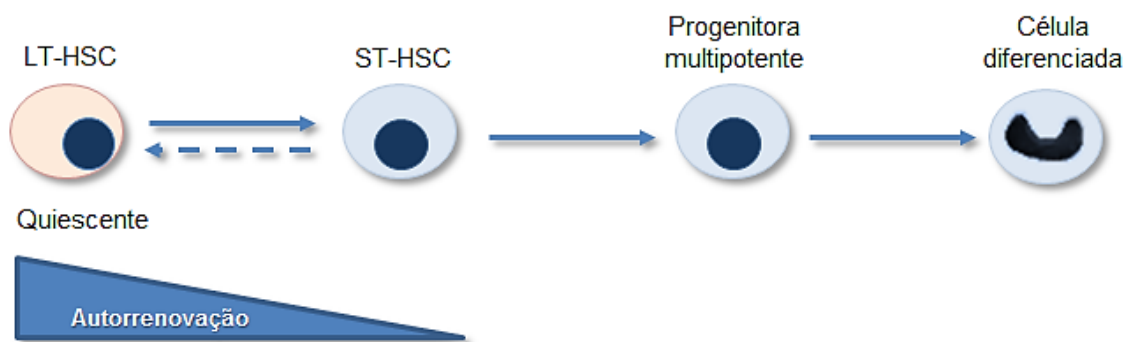


Figura 3 - Organização hierárquica das diferentes populações de progenitores de acordo com o seu potencial de autorrenovação.

Recentemente, a investigação tem apostado na identificação de marcadores de superfície celular característicos das HSCs, permitindo assim o seu isolamento a partir de humanos ou ratos, com altas taxas de pureza (10-50%) [28]. No entanto, apesar dos

esforços, a determinação de uma assinatura molecular ou fenotípica que permita a detecção direta, específica e sensível das HSCs permanece por definir [27].

Entre os principais critérios utilizados para a identificação e isolamento de HSCs destaca-se a expressão, ou a falta de expressão, de marcadores específicos da superfície celular. O isolamento de uma das populações de HSCs melhor caracterizadas em ratos (células KSL) baseia-se na expressão positiva do recetor tirosina cinase c-Kit (CD117) e da glicoproteína de membrana Sca1, concomitantemente com a falta de marcadores finais da diferenciação, conhecidos como marcadores específicos de linhagem ($\text{Lin}^- \text{SCA1}^+ \text{KIT}^+$) [24, 27].

As HSCs estão presentes em diversos tecidos ao longo do desenvolvimento, aparecendo na região mesodérmica embrionária e no saco vitelino, seguido pela placenta, fígado fetal, baço acabando por migrarem para a medula óssea [22]. A medula óssea torna-se assim o principal local de manutenção de HSCs e da hematopoiese. Neste local, a maioria das HSCs encontra-se em quiescência mantendo-se num estado não-proliferativo (fase G0) mas com a capacidade de entrar no ciclo celular em resposta a estímulos extrínsecos (Figura 4) [29, 30].

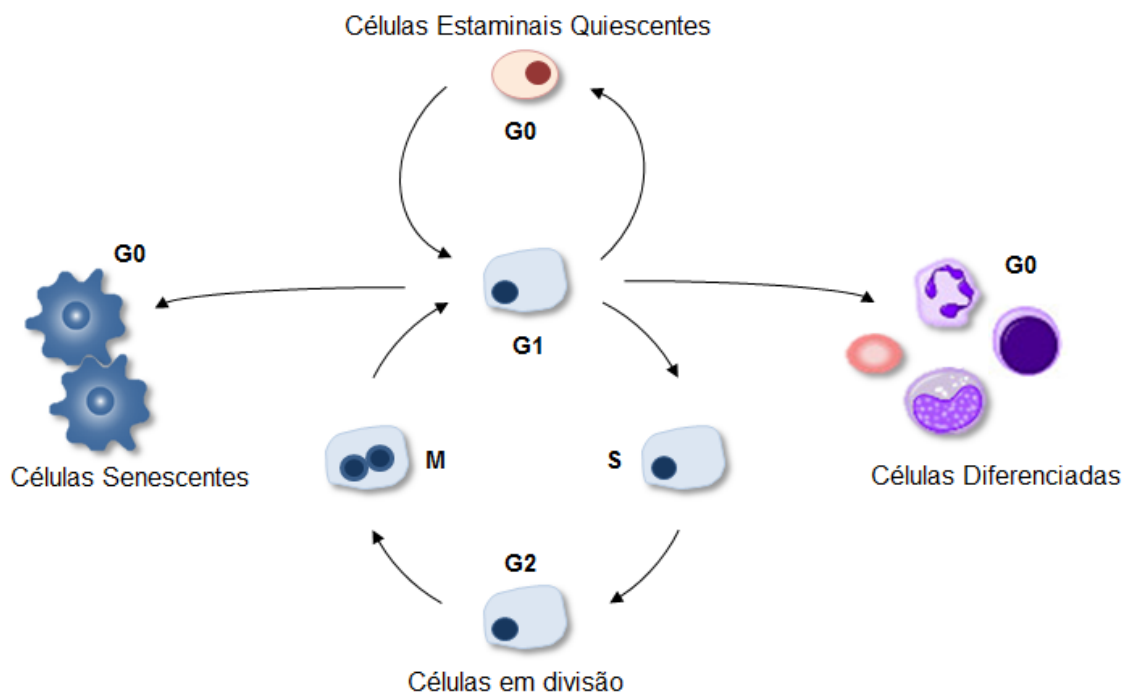


Figura 4 - Esquema do Ciclo Celular e da reversibilidade do estado G0. As células somáticas têm a capacidade de entrar em estados G0 reversíveis (quiescência) ou irreversíveis (senescência e diferenciação) a partir da fase G1 do ciclo celular.

A manutenção da quiescência das HSCs e a regulação da sua autorrenovação e diferenciação é dependente do microambiente específico, conhecido com nicho das células estaminais (*stem cell niche*) [24].

O nicho é composto por uma grande variedade de fatores celulares e humorais. Contudo, determinar quais as células vizinhas das HSCs que regulam a sua manutenção tem sido complicado devido à dificuldade em manter a integridade histológica aquando do seccionamento do osso, bem como a complexidade dos métodos imunohistoquímicos, que são necessários para identificar as HSCs [22].

A hipótese mais recente relativa aos nichos das HSCs classifica essa região em dois componentes: nicho osteoblástico e nicho perivascular. O nicho osteoblástico endosteal fornece um microambiente favorável para quiescência, e o nicho perivascular perto do endotélio vascular que regula a proliferação, a diferenciação e a mobilização das HSCs [31]. No entanto, ainda não existe um consenso relativo à estrutura anatómica e celular dos nichos, surgindo ainda a possibilidade da existência de nichos especializados para as diferentes subpopulações de HSCs [32].

O equilíbrio entre a quiescência e a proliferação é firmemente controlado quer por mecanismos intrínsecos das HSCs quer pela interação das HSCs com seu microambiente, por meio de interações célula-célula, célula-matriz extracelular e recetor-ligando, controlando assim o destino das células [33].

Um assunto atual na área de investigação das células estaminais é a regulação da homeostasia das HSCs pela via da PI3K-AKT-mTOR. Quando as HSCs proliferam, a via da PI3K-AKT-mTOR é ativada por fatores de crescimento e nutrientes, como a glucose e aminoácidos.

A compreensão dos mecanismos de regulação da quiescência das HSCs é de grande importância não só por contribuir para a compreensão das funções fisiológicas das HSCs, mas também a origem fisiopatológica de muitos distúrbios relacionados.

Por fim, a compreensão destes mecanismos permitirá também a manipulação direta da função das HSCs, o que irá melhorar a eficácia do HSCT e do tratamento de diversas doenças hematopoiéticas.

1.3. mTOR: a Via de Sinalização PI3K-AKT-mTOR

As células crescem e proliferam quando estão na presença de nutrientes e de fatores de crescimento desencadeando o catabolismo de hidratos de carbono e a síntese componentes essenciais, como proteínas, nucleótidos e lípidos. A informação relativa à disponibilidade de nutrientes é obtida através de sensores metabólicos sendo depois canalizada por uma complexa rede de vias de sinalização que culmina na determinação de uma função celular.

O alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é um sensor metabólico mestre que integra os estímulos de nutrientes e de fatores de crescimento para regular o a funcionalidade da célula. A via de sinalização de mTOR responde a diversos sinais intracelulares e extracelulares atuando como um regulador central do metabolismo celular, do crescimento, da proliferação e da sobrevivência [34].

A proteína mTOR é uma cinase serina-treonina de 289 kDa, altamente conservada, que pertence à família das cinases relacionadas com a cinase PI3K (do inglês *phosphoinositide 3-kinase*) [35]. Para além do seu domínio cinase, a mTOR é constituída por vários *heat repeats* no seu terminal-N e por um domínio FRAP-ATM-TTRAP (FAT), um domínio FRB e um domínio FACT no terminal carboxilo (Figura 5) [36].

Esta cinase existe na forma de dois complexos funcionalmente e estruturalmente distintos, o complexo 1 de mTOR (mTORC1) e o mTORC2. O mTORC1 é constituído por 6 componentes enquanto o mTORC2 é constituído 7 componentes. Ambos os complexos são constituídos por uma subunidade catalítica mTOR, pela proteína mLST8 (do inglês *mammalian lethal with sec-13 protein 8*), por um domínio DEP contendo a proteína que interage com mTOR (DEPTOR, do inglês *DEP domain containing mTOR-interacting protein*) e pelo complexo Tti1/Tel2 [34, 37]. Por outro lado, a proteína reguladora de mTOR (RAPTOR) e o substrato de AKT rico em prolina de 40 kDa (PRAS40) são específicos do mTORC1, enquanto o mTORC2 é caracterizado pelo companheiro de mTOR insensível à rapamicina (RICTOR), pela mSin1 (*Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1*) e pela proteína observada com o RICTOR-1 e 2 (protor1/2) (Figura 5) [34, 37].

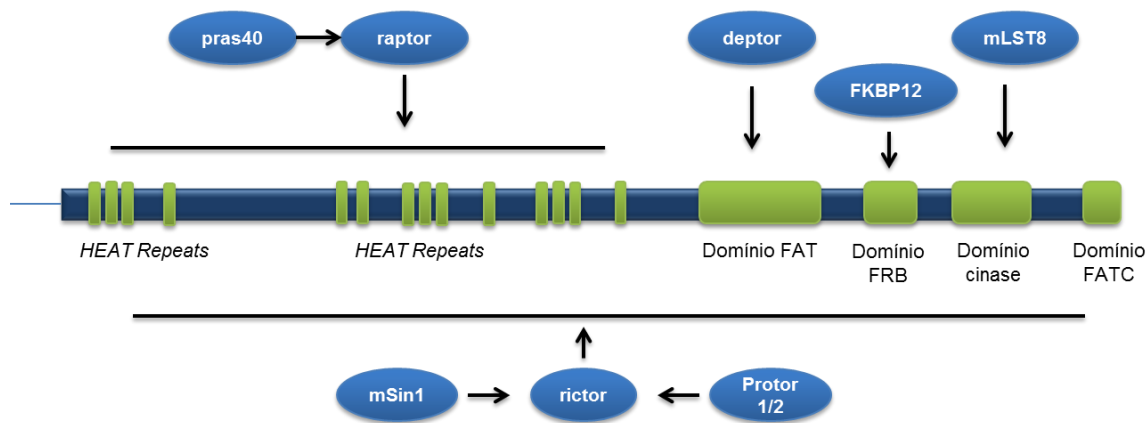


Figura 5 - Esquema da cinase mTOR, dos componentes dos complexos mTORC1 e mTORC2 e dos locais de interação entre eles (adaptado de Laplante *et al.* [34]).

A ativação do mTORC1 é dependente de fatores de crescimento como a insulina, de nutrientes, como aminoácidos, glucose e oxigénio, e do *status* energético celular (rácio ATP/AMP alto). Quando ativado, o mTORC1 promove a síntese proteica, a lipogénese, o metabolismo energético e inibe a autofagia e a biogénese do lisossoma [38]. A ativação do mTORC1 é obtida pela via PI3K-PDK1-AKT através da estimulação de recetores de tirosina cinase (RTKs) (Figura 6). A ativação dos RTKs desencadeia a autofosforilação dos domínios intracelulares dos recetores que servem como “*docking station*” interagindo com o subdomínio p85 da proteína PI3K. Esta interação aproxima a subunidade catalítica p110 da PI3K do substrato PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*) culminando na sua fosforilação e formação de PIP3 [39]. O homólogo da fosfatase e tensina (PTEN) pode desfosforilar a PIP3 de forma regular negativamente a atividade da via de sinalização. O aumento de PIP3 leva ao recrutamento de AKT (do inglês *protein kinase B*) para a membrana, onde é fosforilada e ativada pela PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) [34].

A proteína AKT regula múltiplos processos celulares através dos seus diversos substratos. A AKT fosforila e inativa a PRAS40, atenuando o seu efeito inibitório sobre o mTORC1. Outro substrato desta cinase é o complexo TSC1/2 (*tuberous sclerosis 1/2*) que atua como uma proteína ativadora GTPase (GAP) sobre a *Ras homolog enriched in brain* (Rheb), convertendo-a para a forma inativada ligada a GDP. A forma do Rheb ligada a GTP interage com mTORC1 e estimula a sua atividade de cinase [40].

Relativamente ao mTORC2, a sua ativação é pouco compreendida contudo sabe-se que responde primariamente a fatores de crescimento, promovendo a entrada no ciclo

celular, a sobrevivência celular, e a polarização da actina do citoesqueleto [36]. A ativação do mTORC2, por parte dos fatores de crescimento, parece ser mediada pela associação ribossoma-mTORC2 dependente do PI3K (Figura 6) [40]. O mTORC2 ativado fosforila vários membros da subfamília AGC das cinases, incluindo a AKT, a *serum and glucocorticoid-induced kinase 1* (SGK1), e a proteína-cinase de C- α (PKC- α) [34].

É cada vez mais evidente que a via de sinalização de mTOR desempenha um papel fulcral nas funções celulares mais relevantes devido à grande variedade de proteínas por ela reguladas. Deste modo, a desregulação de mTOR é verificada em diversas patologias, como o cancro, a obesidade, a diabetes tipo 2, e doenças neurodegenerativas, o que leva a um esforço significativo para desenvolver inibidores farmacológicos desta via.

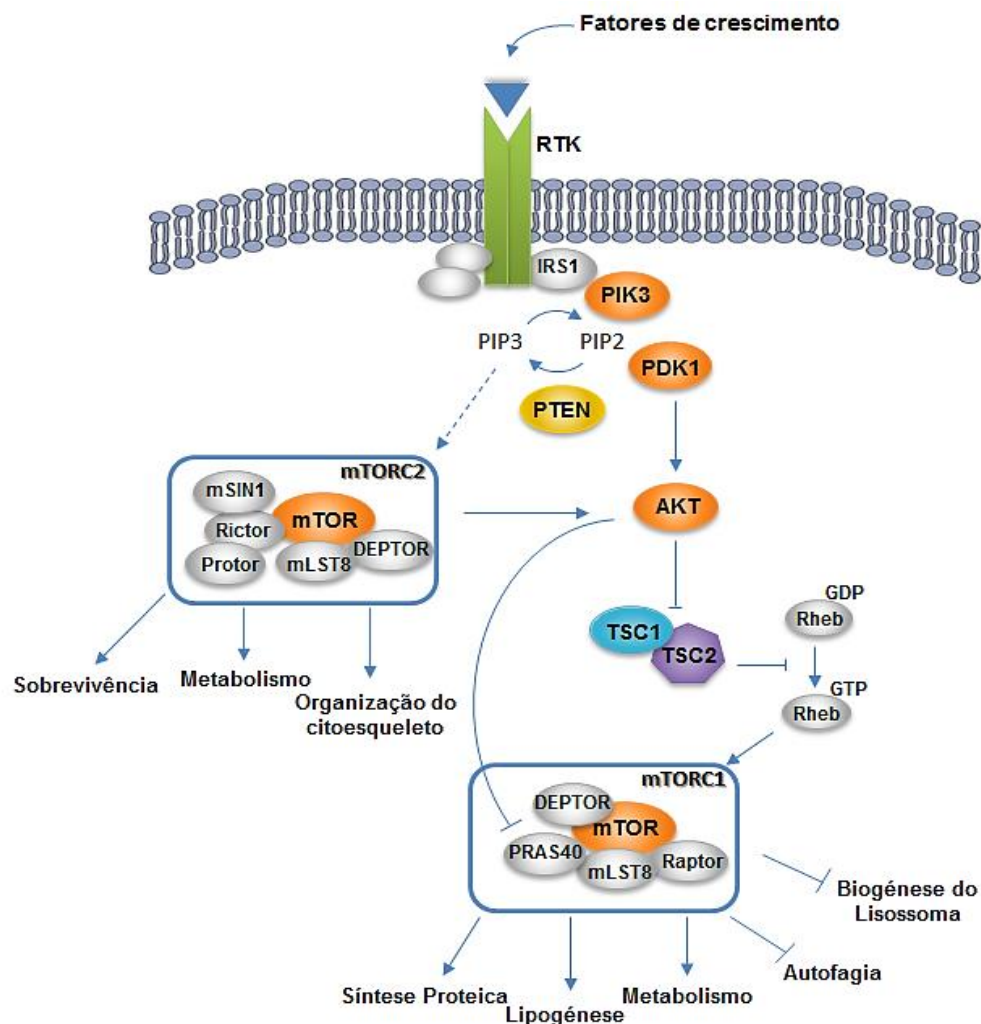


Figura 6 - Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR.

1.4. Papel da via PI3K-AKT-mTOR na quiescência das HSCs

As HSCs encontram-se na medula óssea num ambiente de baixa perfusão, com baixos níveis de oxigénio e de nutrientes. Deste modo, os sistemas de deteção de nutrientes, como a mTOR, integram vias de sinalização que desempenham papéis fundamentais na homeostasia das HSCs. A transição de quiescência para um estado mais proliferativo associado à diferenciação impõe um conjunto requerimentos metabólicos sobre HSCs. As células em proliferação necessitam não só gerar energia como também de ativar um grande número de processos biossintéticos indispensáveis para a replicação celular.

Quando as HSCs entram em proliferação, a via PI3K/AKT/mTOR é ativada por fatores de crescimento e nutrientes, como glucose e aminoácidos, desencadeando toda a cascata de sinalização.

O mTORC1 fosforila os reguladores da tradução: a proteína 1 de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) - 4E-BP1 - e a cinase 1 S6 (S6K1) promovendo a síntese proteica. A fosforilação da 4E-BP1 impede a sua ligação à *cap-binding protein* eIF4E, permitindo que esta integre o complexo eIF4F, necessário para a iniciação da tradução. A ativação da S6K1 leva, através de uma variedade de efetores, a um aumento na biogénese de RNAs mensageiros (mRNA), à iniciação da tradução e ao alongamento [34].

O mTORC1 também regula positivamente o metabolismo celular e a produção de ATP (Figura 7). Este aumenta o fluxo glicolítico, ativando a transcrição e a tradução do fator induzido pela hipoxia 1 α (HIF1 α) que é um regulador positivo de vários genes glicolíticos. O metabolismo e biogénese mitocondriais são também regulados pelo mTORC1 (Figura 7). Este complexo parece aumentar o teor de DNA mitocondrial e a expressão de genes envolvidos no metabolismo oxidativo, em parte, por mediar a associação entre o coativador 1 α de PPAR- γ (PGC1 α) e o fator de transcrição Ying-Yang 1 (YY1), o qual regula positivamente a biogénese mitocondrial e função oxidativa [37].

Por outro lado, o mTORC1 também promove crescimento celular através da inibição da autofagia. A autofagia tem a função de reciclagem dos organelos danificados e de adaptação da célula à falta de nutrientes [34].

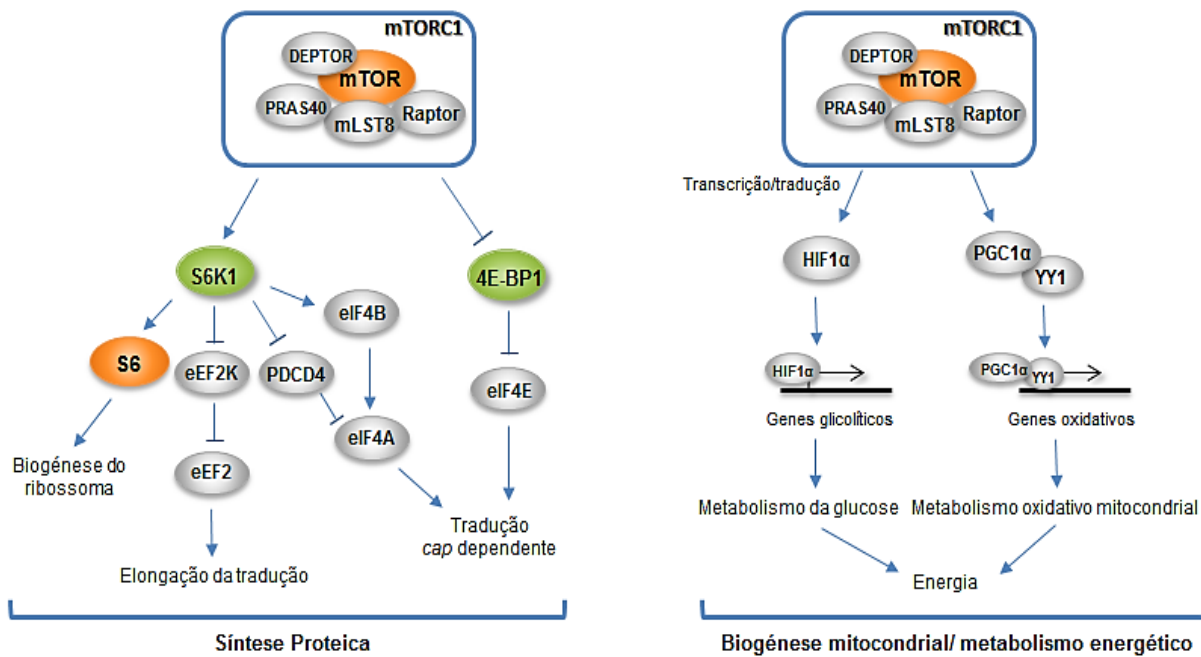


Figura 7 - Elementos *downstream* da via de mTOR.

Diversos modelos genéticos têm evidenciado o papel fundamental da via PI3K/mTOR na regulação da hematopoiese seja por perda de função dos alelos de *PTEN* ou *TSC1* ou por mutações de ganho de função em *AKT*, que resultam no aumento da proliferação e na exaustão das HSCs [41, 42]. Por outro lado, a deleção de *AKT1/2* promove o aumento da quiescência das HSCs [43].

Na ausência de *PTEN*, as HSCs perdem a capacidade de permanecer num estado de quiescência, e entram em ciclo celular, levando transitoriamente a uma expansão do *pool* de HSCs. Contudo, em semanas, ocorre a depleção das HSCs devido à hiperativação de mTOR (Figura 8) [44, 45]. Verificou-se ainda que a deleção de *PTEN* induz uma resposta supressora tumoral nas HSCs caracterizada pelo aumento de expressão de $p16^{\text{Ink4a}}$ e *p53*, e que este efeito é atenuado com o tratamento com rapamicina [46]. Estes supressores tumorais parecem desempenhar um papel na promoção da transição de HSCs para células progenitoras multipotentes, regulando negativamente o potencial de autorrenovação de células multipotentes. Assim, o aumento da expressão de $p16^{\text{Ink4a}}$ e *p53* em HSCs em divisão após deleção de *PTEN* pode acelerar a maturação normal das células que constituem o *pool* de HSCs, levando ao seu esgotamento [46].

A hiperativação de mTOR por deleção de *Tsc1* resulta numa rápida passagem do estado de quiescência para a progressão do ciclo celular, verificando-se ainda um aumento da biogénese mitocondrial e dos níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS) [47].

Várias vias de sinalização estão a emergir como elementos reguladores da manutenção de HSCs, como as que envolvem as necessidades energéticas e biossintéticas que cooperativamente mantêm a capacidade de autorrenovação e o *status* quiescente das HSCs.

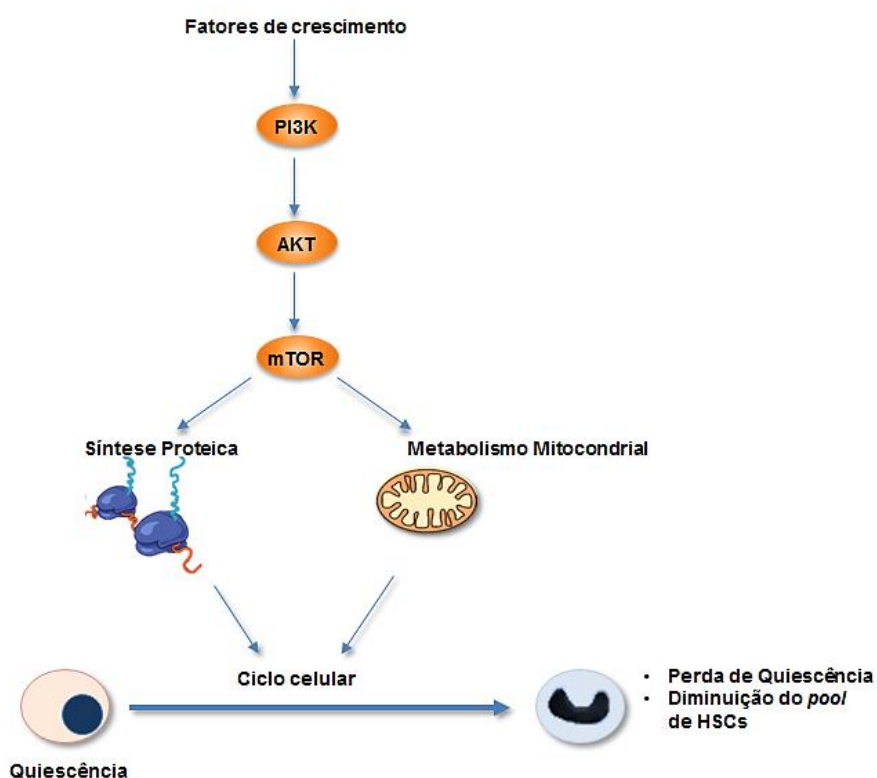


Figura 8 - Influência da via PI3K/AKT/mTOR no destino das HSCs.

1.5. microRNAs

Estudos recentes têm sugerido um envolvimento de microRNAs (miRNAs) no controlo da biologia das células estaminais da medula óssea. Perfis de miRNAs foram recentemente identificados em várias populações de células estaminais, entre elas as HSCs. Além disso, a manipulação dos níveis de miRNA nas células estaminais/progenitoras tem demonstrado que se correlacionam com alterações nas propriedades celulares ou na diferenciação, sugerindo um papel essencial dos miRNAs no controlo da diferenciação e função de células estaminais da medula óssea [48, 49].

Os miRNAs consistem em pequenos RNAs não-codificantes, com cerca de 22 nucleótidos que desempenham um papel essencial na regulação pós-transcrição de mRNAs alvos. A ação dos miRNAs pode resultar numa repressão da tradução ou na degradação do mRNA dependendo do grau de complementaridade entre miRNAs e as sequências de mRNA alvos [50].

A biogénese dos miRNAs é um processo enzimático multifásico que se inicia com a transcrição de um miRNA primário (pri-miRNA) pela ação RNA polimerase II (Figura 9). Ainda no núcleo, o pri-miRNA é processado pelo complexo microprocessador nuclear formado pela enzima DROSHA, uma enzima RNase III classe 2, e seu parceiro de ligação DGCR8 (do inglês: *DiGeorge syndrome critical region 8 protein*) dando origem a um miRNA precursor (pré-miRNA). Os dois domínios RNase da DROSHA clivam as terminações 5' e 3' do pri-miRNA, enquanto que a DGCR8 determina o local exato de clivagem [51].

Após o processamento nuclear, o pré-miRNA é ativamente transportado para o citoplasma pela Exportina-5 (XPO-5) em complexo com o cofactor Ran-GTP; uma vez no citoplasma a hidrólise do GTP em GDP permite a libertação do pré-miRNA. Além da sua função de transporte, a XPO-5 também estabiliza os pré-miRNAs, impedindo a sua degradação por exonucleases [52].

Uma vez exportado para fora do núcleo, os miRNAs sofrem novo processamento pela endonuclease citoplasmática RNase III Dicer, de forma a alcançarem a sua forma madura, uma molécula de cadeia dupla de 21-24 nucleótidos (miRNA/miRNA* duplex) [53]. Após a clivagem mediada pela Dicer, o duplex de cadeia dupla deve ser separado dando origem à cadeia guia funcional, que é incorporada no *miRNA-induced silencing complex* (miRISC), e à cadeia *passenger*, que é subseqüentemente degradada [54]. Esta assimetria funcional depende da estabilidade termodinâmica das duas extremidades do duplex: a cadeia de miRNA menos estável na sua extremidade 5' do duplex é incorporada

no complexo miRISC [51]. A formação deste complexo é mediada por um complexo multiproteico composto pela Dicer, TRBP (*Tar RNA binding protein*), e PACT (*protein activator of PKR*) e pelo componente central a proteína *Argonaute-2* (Ago2) [55]. Finalmente, o complexo miRISC medeia a ligação do miRNA maduro de cadeia simples à 3'-*untranslated region* (UTR) do mRNA alvo, com base na complementaridade parcial resultando na degradação do mRNA ou na inibição da tradução [55]. Como consequência final, ocorrerá um decréscimo na quantidade de proteína codificada pelo mRNA que foi alvo de regulação [56].

Desde a descoberta dos miRNAs, tornou-se claro o seu envolvimento em diversos processos celulares, assim como a sua desregulação tinha impacto no desenvolvimento de diversas patologias. Tendo em conta que um único miRNA pode ter vários mRNAs alvo e um único mRNA pode ser alvo de vários miRNAs, calcula-se que 60% de todos os mRNAs humanos são regulados por miRNAs [57]. Assim, os miRNAs representam uma ferramenta dúctil que adiciona vários pontos de regulação sofisticados às vias de sinalização envolvidas no controlo da homeostasia proliferativa, da diferenciação ou da *stemness* celular.

A descoberta dos miRNAs permitiu explicar de que forma as células adquirem funcionalidades distintas em resposta a um número limitado de sinais de sinalização. Esta resposta é dependente da capacidade da célula de receber sinais extracelulares quantitativamente, isto é, pela sua intensidade e duração, e de consequentemente ativar diferentes programas de expressão genética através da regulação por miRNAs [58].

Portanto, os miRNAs constituem uma das classes mais abundantes de moléculas reguladoras genéticas e dado o grande impacto dos miRNAs na expressão dos genes, não é surpreendente que alterações nestas moléculas desempenhem um papel fundamental no desenvolvimento de doenças. Tem vindo a ser demonstrado, que os miRNAs se encontram desregulados nas diversas neoplasias, e que podem iniciar a carcinogénese e/ou conduzir à progressão tumoral afetando deste modo o *outcome* dos doentes [57]. Além disso, a determinação de perfis de expressão de miRNA poderá ser útil para prever o *outcome* clínico dos doentes.

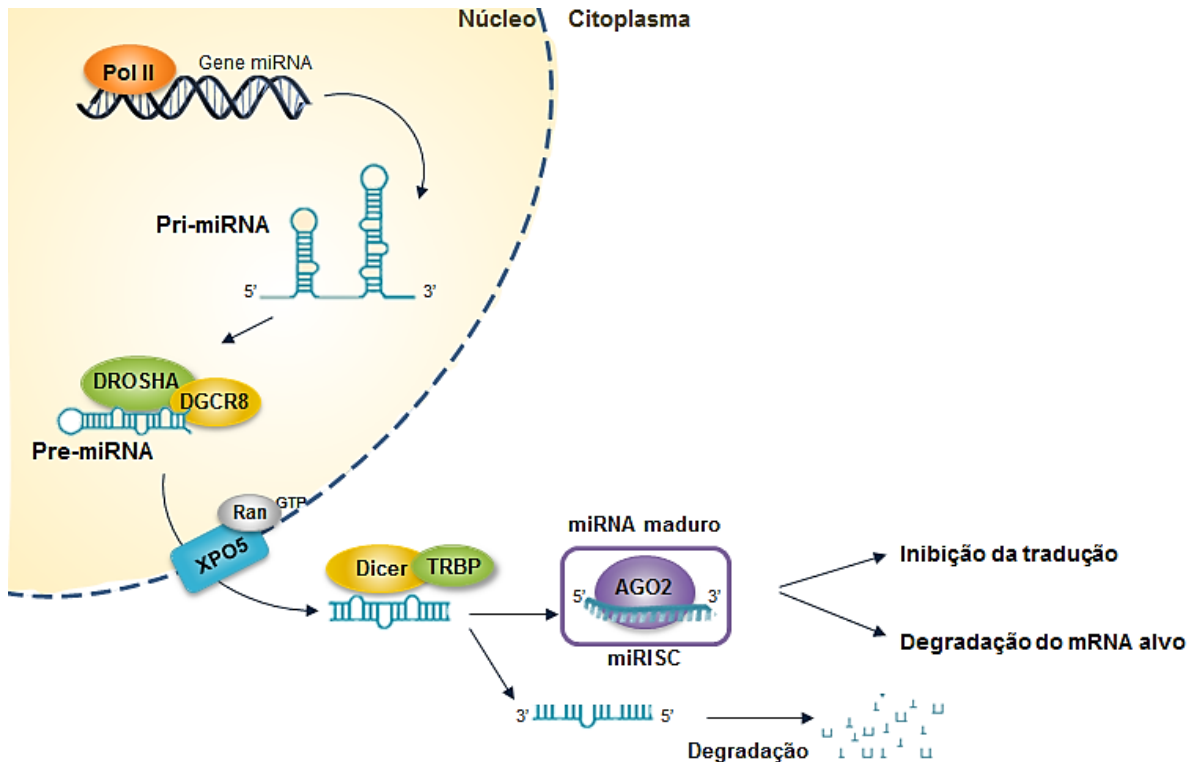


Figura 9 - Mecanismo de biogênese e processamento de miRNAs (adaptado de Inui *et al.* [58]).

1.6. miRNA-101 e a via mTOR

O miR-101 pertence a uma família de miRNAs envolvidos em várias funções celulares, incluindo a proliferação celular, invasão e apoptose. Em 2002, Mourelato e colaboradores determinaram a sequência madura do miR-101 com 22 nucleótidos, UACAGUACUGUGUAUACUGAAG [59]. Foram identificados dois *loci* genômicos do miR-101, um no cromossoma 1p31.3 (miR-101-1) e outro no cromossoma 9p24.1 (miR-101-2). Mais especificamente, o miR-101-1 é codificado por uma unidade de transcrição não-codificadora de proteína no exão 2 do gene do recetor da interleucina 23 (IL23R), enquanto que o miR-101-2 é codificado pelo intrão 8 do gene codificador da proteína *RNA terminal phosphatase cyclase-like 1* (RCL1) [60].

Em diversos estudos verificou-se que o miR-101 se encontra frequentemente sub-expresso nos tecidos e nas células em diversas neoplasias, como o cancro de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma pancreático, glioblastoma, cancro da próstata,

carcinoma esofágico, carcinoma do ovário, cancro do pulmão de células não-pequenas e cancro gástrico [61-66].

Estudos recentes revelaram que o miR-101 teria uma função de supressor tumoral sendo capaz de inibir o crescimento de células e que a perda genômica deste miRNA oferece uma vantagem proliferativa às células tumorais pela sobreexpressão de EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*, uma metiltransferase) [62, 67]. Além disso, o Mcl-1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*), membro da família de Bcl-2 anti-apoptótica, foi caracterizado como um alvo direto do miR-101 [61].

No estudo sobre o cancro da mama realizado por Frankel e colaboradores em 2011, o miR-101 é identificado como um supressor tumoral e como um potente inibidor da autofagia basal e induzida pela rapamicina. Através de perfis de transcriptoma, Frankel identificou três novos alvos deste miRNA: STMN1, RAB5A e ATG4D [68].

O envolvimento do miR-101 também foi descrito na regulação da resposta imunitária inata dos macrófagos aos lipopolissacarídeos (LPS), via *MAPK phosphatase-1* (MKP-1) que desativa as cinases MAPKs (do inglês: *Mitogen-activated protein kinases*) [69].

Em 2012, Chen e os seus colaboradores realizaram uma análise bioinformática de forma a identificar os putativos alvos moleculares do miR-101. O alinhamento das sequências de miR-101 com 3'UTR do gene humano de mTOR permitiu determinar um local de ligação do miR-101 (nucleótidos 7902-7908 em mTOR) que é altamente conservado entre os vertebrados, indicando que o gene de mTOR é um potencial gene-alvo do miR-101. Verificou ainda que o miR-101 regula negativamente a expressão do *reporter gene* que contem a 3'UTR de mTOR, suprimindo os níveis de proteína mTOR (Figura 10) [70]. Portanto, a inibição de mTOR pelo miR-101 tem como consequências funcionais a diminuição do metabolismo celular, do crescimento, da proliferação e da sobrevivência celular.

Tendo em conta o papel do miR-101 na regulação de mTOR, a presença de variações genéticas na sequência deste miRNA poderá alterar a expressão e/ou a maturação do mesmo e conseqüentemente alterar a via de sinalização PI3K-AKT-mTOR.

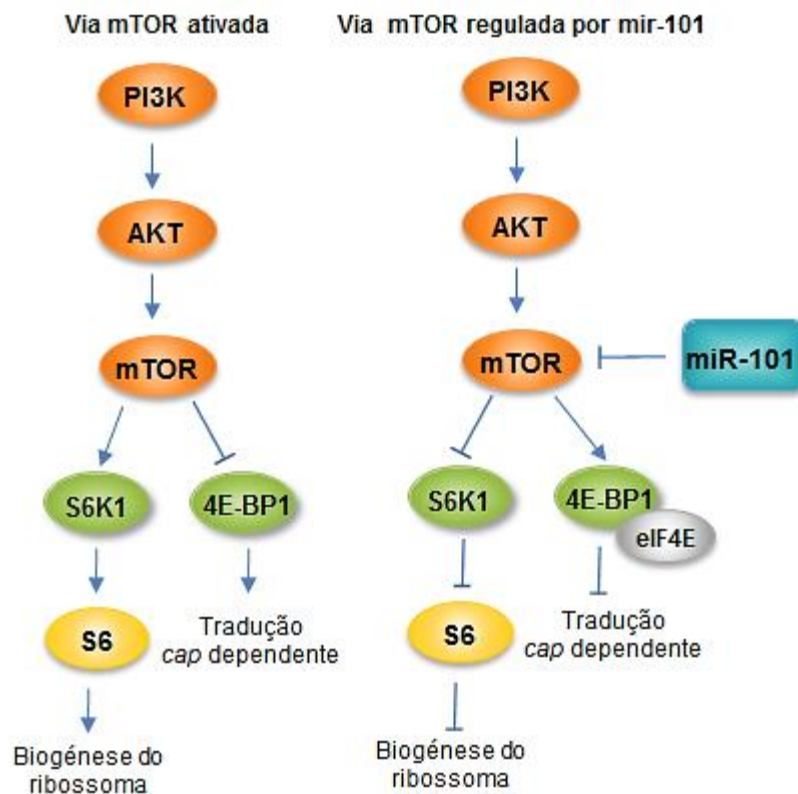


Figura 10 - Via mTOR regulada pelo miR-101.

1.7. Polimorfismos Genéticos no *miR-101*

Alterações no microambiente celular devido à ocorrência de polimorfismos genéticos funcionais poderão alterar a homeostasia das HSCs favorecendo a ativação de determinadas cascatas de sinalização e inibindo outras. Uma das consequências da modificação do microambiente celular poderá ser a alteração da expressão de miRNAs. Estudos recentes demonstraram também que a ocorrência de variações de nucleótidos na sequência dos genes codificadores de miRNAs pode modular o processamento dos mesmos e consequentemente alterar os níveis de expressão [71].

Os polimorfismos genéticos são definidos como a ocorrência simultânea, numa população, de duas ou mais formas alternativas de um gene ou de uma sequência de DNA, em que a variante menos frequente está presente em pelo menos 1% da população [72, 73]. Dentro do vasto grupo de polimorfismos genéticos verificou-se que os mais comuns no genoma consistem na transição de apenas um nucleótido em *loci* específicos

do DNA, designando-se de *Single-Nucleotide-Polymorphisms* (SNPs) [72]. Os SNPs constituem a principal fonte de diversidade interindividual, sendo que cada indivíduo é portador de um vasto grupo de polimorfismos que lhe confere um património genético único e individual [72].

Os SNPs em genes codificadores de miRNAs parecem afetar a sua função de uma de três maneiras: em primeiro lugar, pela alteração da transcrição do transcrito primário; segundo, através da alteração do processamento do pri-miRNA e do pré-miRNA; e em terceiro, por alteração da interação miRNA-mRNA [71].

A primeira demonstração de que SNPs em genes codificantes de miRNAs podem afetar o fenótipo foi realizada por Abelson e os seus colaboradores, que descobriram que a alteração no miR-189 no sítio de ligação da SLITRK1 estava associada com a Síndrome de *Tourette* [74].

Dois dos polimorfismos descritos na literatura no miR-101 são o *rs7536540* (G>C) e o *rs12375841* (T>C), localizados, o primeiro, na posição -391 na região 5' e o segundo, na posição +591 numa região intrónica, dos respetivos genes (Tabela 2) [75].

No estudo de Bae e colaboradores, no qual foram estudadas variações nas sequências do miR-101, foi demonstrado que a variante C do polimorfismo *miR-101 rs7536540* parece ter um efeito protetor no desenvolvimento de cirrose hepática e posterior desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em doentes com hepatite crónica, enquanto que a variante C do polimorfismo *miR-101 rs12375841* estará relacionado com a eliminação da infeção por vírus da hepatite B (HBV) [75].

Uma vez que o miR-101 parece ter um papel chave na diferenciação das HSCs, por proporcionar potencialmente diferente intensidade de ativação da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, é pertinente compreender de que forma variantes genéticas funcionais nos genes codificantes do miR-101, condicionam o *outcome* dos doentes submetidos a HSCT.

Tabela 2 - Frequência genómica dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* nas populações Europeia, Asiática e Africana (Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

	<i>rs7536540</i>			<i>rs12375841</i>		
	C/C	C/G	G/G	C/C	C/T	T/T
Europeus	0.067	0.350	0.583	0.083	0.417	0.500
Asiáticos	0.111	0.533	0.356	0.091	0.409	0.500
Africanos	0.267	0.550	0.183	0.237	0.492	0.271

Polimorfismos genéticos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* e a sua influência no *outcome* clínico de indivíduos submetidos a HSCT



2. OBJETIVOS

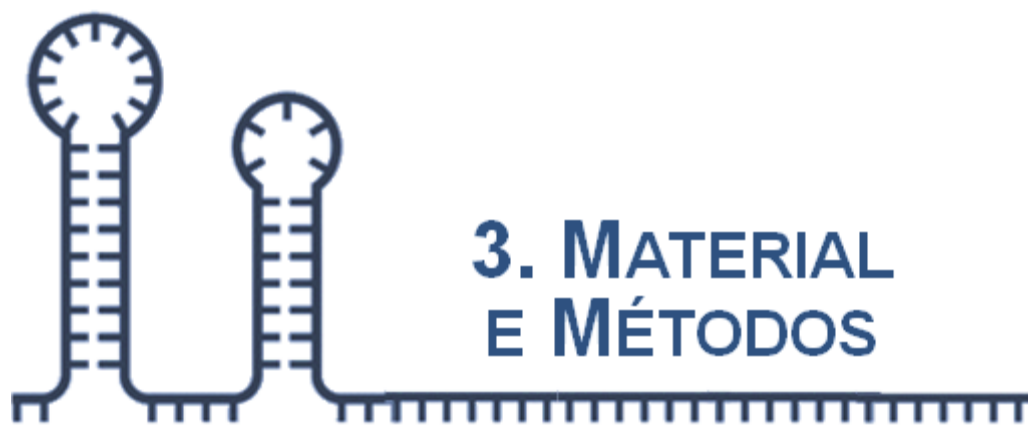
No presente trabalho foi desenvolvido um estudo do tipo coorte retrospectiva com os seguintes objetivos:

2.1. Objetivo Geral

Estudar a influência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841*, na sobrevivência global de indivíduos submetidos a transplante de células estaminais hematopoiéticas (HSCT) alogénico.

2.2. Objetivos Específicos

1. Analisar a frequência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* em indivíduos submetidos a HSCT;
2. Avaliar a influência dos polimorfismos estudados na sobrevivência de indivíduos submetidos a HSCT após 6 meses do HSCT;
3. Avaliar a influência dos polimorfismos na sobrevivência de indivíduos submetidos a HSCT nos primeiros 12 meses de *follow-up*;
4. Avaliar a influência da infecção por HCMV na sobrevivência de indivíduos submetidos a HSCT;
5. Analisar o efeito funcional dos polimorfismos estudados na biodisponibilidade dos respetivos miRNAs.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População

O estudo de variações genéticas no gene do *miR-101*, envolvido na inibição do mRNA de *mTOR*, foi realizado com base num estudo do tipo coorte retrospectiva. Na coorte histórica, foram englobados doentes submetidos a HSCT alogénico no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto) entre Janeiro de 2008 e Setembro 2012.

Participaram no estudo cento e setenta e nove (n=179) indivíduos, sendo setenta e três (n=73, 40,8%) do género feminino e cento e seis (n=106, 59,2%) do género masculino, com uma média de idade de 35,0 ±19,0 anos (Tabela 3). Do grupo de casos em estudo, 95 (53,1%) foram diagnosticados com leucemia aguda, 38 (21,2%) com doenças linfoproliferativas crónicas, 16 (8,9%) com doenças mieloproliferativas crónicas, 17 (9,5%) com síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos e 13 (7,3%) com anemia aplástica. Os dados demográficos, clinicopatológicos, evolução da doença, assim como os dados de serologia e de monitorização da infeção por HCMV foram obtidos através da consulta dos processos clínicos de cada doente.

De forma a analisar a influência dos polimorfismos em estudo na biodisponibilidade do miR-101 foi recrutado um grupo controlo constituído por cinquenta e três indivíduos saudáveis (n=53), com uma média de idade de 42,7 ±15,1 anos, dos quais trinta e seis (n=36, 67,9%) foram mulheres e dezassete (n=17, 32,1%) foram homens, recrutados aleatoriamente a partir da população do norte de Portugal. Os critérios de inclusão no estudo foram: não ter evidência de doença neoplásica ou de infeção, ter idade superior a 18 anos e serem indivíduos caucasianos. Todos os indivíduos incluídos assinaram o consentimento informado para utilização das amostras biológicas, de acordo com a declaração de Helsínquia.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas do grupo de casos submetidos a HSCT e características gerais do grupo de controlo.

	Casos		Controlos	
	(N Total = 179)		(N Total = 53)	
	n	%	n	%
Idade				
Média ± SD	35,0 ± 19,0		42,73 ± 15,1	
Género				
Masculino	106	59,2	17	32,1
Feminino	73	40,8	36	67,9
Total	179	100	53	100
Patologia				
Leucemias Agudas	95	53,1		
Doenças Linfoproliferativas Crónicas	38	21,2		
Doenças Mieloproliferativas Crónicas	16	8,9		
Síndromes Mielodisplásicos /Mieloproliferativos	17	9,5		
Anemia Aplástica	13	7,3		
Total	179	100		
Infeção ativa por HCMV*				
Positivo	102	57,0		
Negativo	77	43,0		
Total	179	100		

* Detetada por antigenemia por pesquisa da pp65 ou por quantificação da carga viral por PCR em tempo-real

3.2. Procedimentos Laboratoriais

A todos os participantes do estudo foi colhida uma amostra de sangue periférico de 8ml, aproximadamente, por venopunção da região antecubital. Todas as amostras de sangue do grupo de indivíduos submetidos a HSCT foram recolhidas no período pós-transplante.

3.2.1. Extração de DNA genómico

Após a colheita das amostras procedeu-se à extração de DNA genómico a partir das células nucleadas do sangue periférico, com recurso ao *kit* de extração da *FavorPrep® Genomic DNA Mini Kit*. A extração do DNA foi realizada recorrendo a um sistema de colunas de centrifugação, de acordo com as especificações do fornecedor.

Este procedimento laboratorial baseia-se na grande afinidade de ligação do DNA à sílica que reveste as membranas das colunas de centrifugação. As colunas utilizadas possuem ainda resinas com partículas, em suspensão alcoólica, de elevadas concentrações de sais caotrópicos, capazes de desnaturar proteínas. O procedimento de extração de DNA é constituído por três etapas: absorção, lavagem e eluição. Para que ocorra a absorção, ou seja, a ligação do DNA às partículas de sílica, é necessário um baixo valor de pH. Após esta fase, sucedem-se diversas lavagens, com vários tampões com etanol, com o objetivo de remover as proteínas, os polissacarídeos e os sais. Na última fase, o DNA é eluído num tampão de eluição, de baixa concentração salina e elevado pH.

Após o isolamento do DNA genómico, a sua concentração e pureza foi determinada por mediação da absorvência a 260 e 280 nm usando o espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000*.

3.2.2. Genotipagem dos polimorfismos

A caracterização genotípica de todos os indivíduos participantes no estudo foi realizada através do método de discriminação alélica por *Real – Time Polymerase Chain Reaction* (Real-Time-PCR), com recurso a tecnologia TaqMan® (*Applied Biosystems®*). Foram utilizados TaqMan® assays C__26137992_10 e C__31941941_10 (*Applied*

Biosystems[®]), em que as sondas marcadas com fluorocromos possuíam complementaridade para cada uma das sequências nucleotídicas: *rs7536540* (G>C): VIC-alelo C (TCATATATATACCGAGGAACTACTACGTTCTAAAGCCCTCTTCTAGATGTT), FAM-alelo G (TCATATATATACCGAGGAACTACTAGGTTCTAAAGCCCTCTTCTAGATGTT); *rs12375841* (T>C): VIC-alelo C (ATGACACTGTGAAAGAAGCATTTCCTATTGATAGTAAATGAGGTTGCGGAA), FAM-alelo T (ATGACACTGTGAAAGAAGCATTTCCTATTGATAGTAAATGAGGTTGCGGAA).

A reação de amplificação foi efetuada para um volume de 6 µl por amostra, contendo 2,5 µl de 2x TaqMan[®] *Genotyping Master Mix*, 0,125 µl de 40x TaqMan[®] *Genotyping Assay* e 2,375 µl de água bidestilada, à qual se adicionou 1 µl de DNA.

Os produtos amplificados foram detetados e analisados recorrendo ao aparelho *Real-Time 7300 ABI* e através do *software 7300 System Sequence Detection* (versão 1.2.3 *Applied Biosystems*[®]). As condições da reação foram as seguintes: ativação da Taq DNA Polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para a desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para o emparelhamento dos *primers* e extensão (Figura 11).

De modo a garantir a qualidade da genotipagem foram respeitados os seguintes critérios de qualidade: foram utilizados controlos negativos para confirmar a ausência de contaminação, confirmação dos resultados por 2 investigadores independentes, e o procedimento de genotipagem foi repetido em 10% das amostras, com reprodutibilidade total.

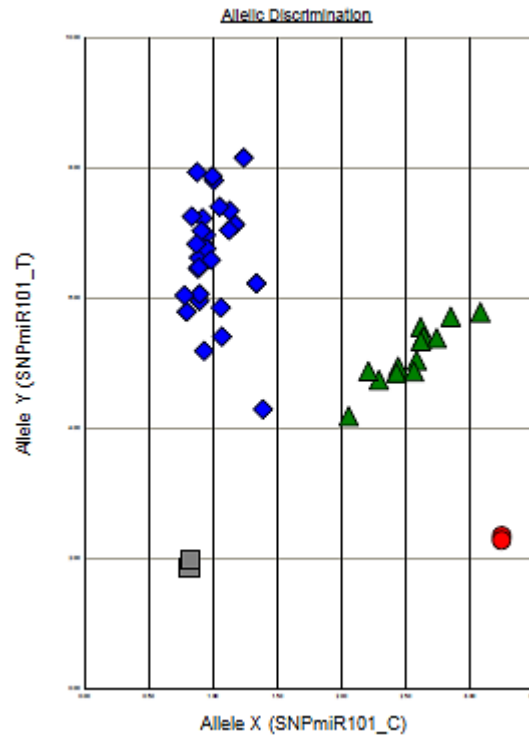


Figura 11 - Representação de um *Real-time PCR* para o polimorfismo *rs12375841*. (azul: homozigóticos T; vermelho: homozigóticos C; verde: heterozigóticos; cinzento: controlos negativos)

3.2.3. Extração de miRNA

Após a colheita das amostras do grupo controlo procedeu-se também à extração de miRNA por um método de extração por colunas, com recurso ao *kit* comercial de extração *Grisp® GRS miRNA kit*.

Este procedimento baseia-se no uso de sais caotrópicos e de várias concentrações de etanol que permitem a ligação seletiva de RNAs de tamanhos específicos à membrana da coluna de centrifugação. Os contaminantes são completamente removidos usando um tampão de lavagem (contendo etanol) durante uma centrifugação.

O miRNA purificado é, subsequentemente, eluído num tampão de eluição específico sem RNAase.

Por fim, determinou-se a concentração e a pureza da amostra por mediação da absorvência a 260 e 280 nm usando o espectrofotómetro *NanoDrop® ND- 1000*.

3.2.4. Quantificação do miRNA

A consequência funcional dos polimorfismos genéticos *miR-101 rs7536540* (G>C) e *miR-101 rs12375841* (T>C) na expressão do *miR-101*, foi avaliada quantificando-se os níveis de *miR-101* na população controlo, consoante o polimorfismo.

A quantificação relativa do miRNA-101 foi realizada por *Real-Time PCR* com recurso ao aparelho *StepOne® Real-Time PCR System* e a *TaqMan® MicroRNA Assays* da *Applied Biosystems®* (Figura 12).

A reação continha 1X master mix (*Applied Biosystems®*), 1X sonda específica (*TaqMan® MicroRNA Assay 002143, Applied Biosystems®*), uma amostra de cDNA e como controlo endógeno foi utilizado o miRNA RNU48 de forma a normalizar os resultados (*TaqMan® MicroRNA Assay 001006, Applied Biosystems®*).

Como controlo de qualidade da quantificação, foram utilizados controlos negativos para confirmar a ausência de contaminação, realizando-se também análises das amostras em duplicado.

A análise dos resultados foi realizada com recurso ao *StepOne™ Software v2.2* (*Applied Biosystems®*). O método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (método de *Livak*) e o teste *t' de Student* foram usados para avaliar as diferenças nos níveis normalizados do miRNA analisado.

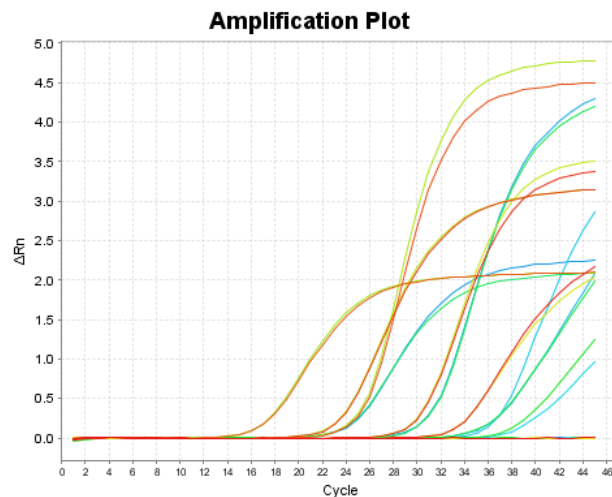


Figura 12 - Curvas de amplificação da expressão relativa do miRNA.

3.3. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do *software* estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, versão 22).

Os níveis de expressão do miRNA no grupo controlo foram avaliados por quantificação relativa, sendo que as diferenças médias de expressão foram determinadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*Livak Method*).

A sobrevivência global a um ano, correspondente à sobrevivência nos primeiros 12 meses após HSCT (*short-term survival*) e a sobrevivência global referente à sobrevivência a partir do sexto mês após o transplante até à última observação ou morte (*long-term survival*), foram avaliadas através de curvas de sobrevivência segundo o modelo de *Kaplan-Meier* e a comparação dos genótipos dos polimorfismos estudados avaliada pelo teste de *Log rank*. O valor de *p* foi obtido é considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.



4.1. Frequência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* nos indivíduos submetidos a HSCT e na população controle

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos de casos e controles, de acordo com os genótipos permitiu observar que as frequências genotípicas observadas eram similares às esperadas para o polimorfismo *miR-101 rs7536540* (casos, $P=0,858$; controles, $P=0,504$), para o polimorfismo *miR-101 rs12375841* (casos, $P=0,688$; controles, $P=0,516$).

Quanto ao polimorfismo *miR-101 rs7536540*, dos 179 indivíduos submetidos a HSCT incluídos no estudo, 53,6% são portadores do genótipo GG, 39,7% do genótipo GC e do 6,7% do genótipo CC (Figura 13). Relativamente ao grupo controle, dos 53 indivíduos incluídos neste estudo, 50,9% são portadores genótipo GG, 43,4% genótipo GC e 5,7% genótipo CC (Tabela 4).

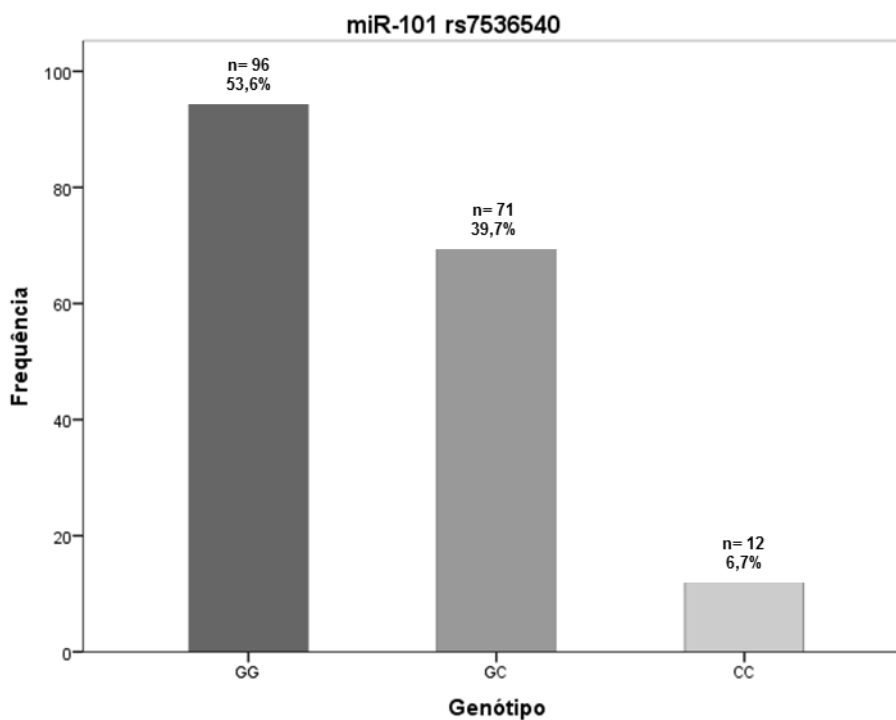


Figura 13 - Gráfico relativo às frequências do polimorfismo *miR-101 rs7536540* no grupo de indivíduos submetidos a HSCT.

Tabela 4 - Frequências genóticas do polimorfismo *miR-101 rs7536540* no grupo de indivíduos controle

Polimorfismo	Genótipo	Frequência (%) N=53
<i>miR-101 rs7536540</i>	GG	27 (50,9)
	GC	23 (43,4)
	CC	3 (5,7)

Relativamente à distribuição dos genótipos do polimorfismo *miR-101 rs12375841* no grupo em estudo de indivíduos submetidos a HSCT alogénico, 64,2% eram portadores do genótipo TT, 32,4% do genótipo TC e 3,4% do genótipo CC (Figura 14). Nos 53 indivíduos do grupo controle, obtiveram-se que 71,7% dos indivíduos são portadores do genótipo TT, 24,5% do genótipo TC e 3,8% do genótipo CC (Tabela 5).

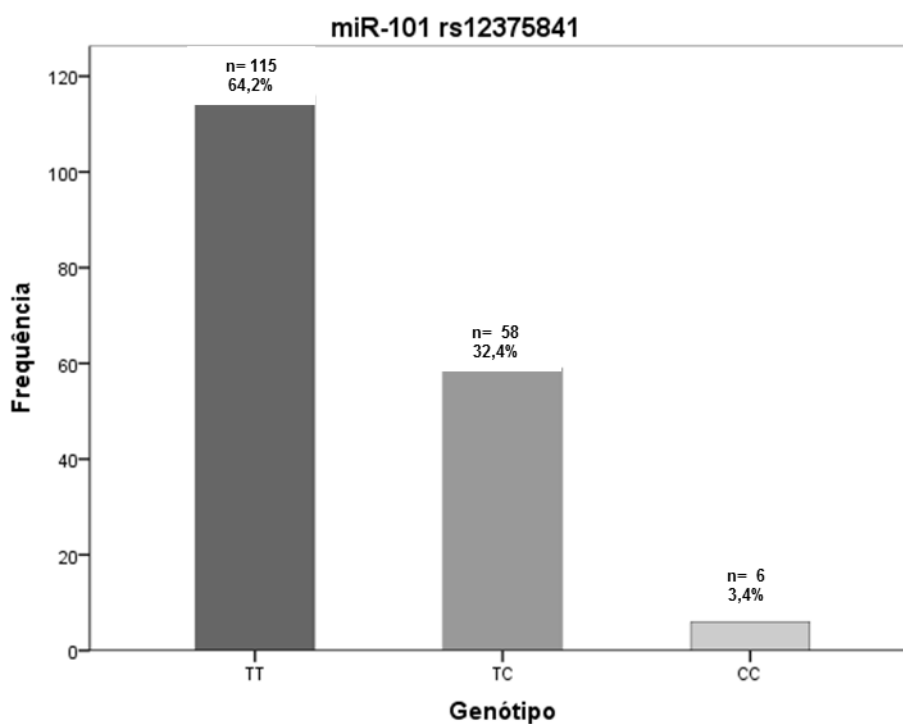
**Figura 14** - Gráfico relativo às frequências do polimorfismo *miR-101 rs12375841* no grupo de indivíduos submetidos a HSCT.

Tabela 5 - Frequências genotípicas do polimorfismo *miR-101 rs12375841* no grupo de indivíduos controle

Polimorfismo	Genótipo	Frequência (%) N=53
<i>miR-101 rs12375841</i>	TT	38 (71,7)
	TC	13 (24,5)
	CC	2 (3,8)

4.2. Influência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* na sobrevivência global após HSCT

A análise das curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* para o polimorfismo *miR-101 rs7536540* (Figura 15A), não evidencia qualquer associação estatisticamente significativa entre os genótipos do polimorfismo estudado e a sobrevivência após 6 meses do transplante, sendo esta de 45,5 meses nos portadores do genótipo GG e de 42,1 meses para os indivíduos portadores dos genótipos GC/CC ($P=0,698$).

Relativamente à análise das curvas de sobrevivência obtidas para o polimorfismo *miR-101 rs12375841* (Figura 15B), evidencia uma probabilidade cumulativa de uma maior sobrevivência nos indivíduos portadores dos genótipos TC/CC. A sobrevivência é significativamente superior nos portadores dos genótipos TC/CC em comparação com os homocigóticos TT (47,1 *versus* 41,4 meses, respectivamente, $P=0,011$).

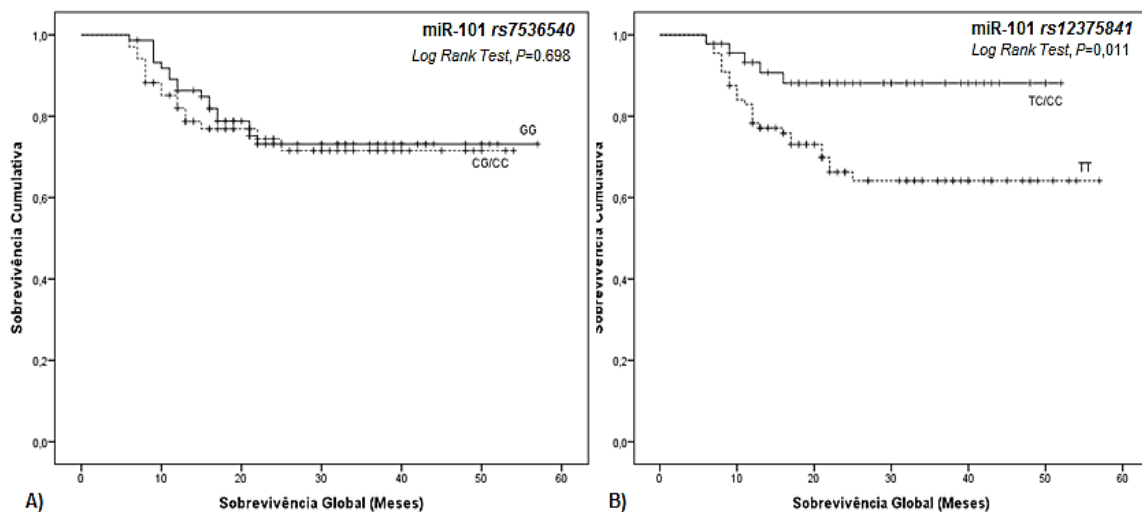


Figura 15 - Curvas de Sobrevivência global de *Kaplan-Meier* e teste *Log Rank* de indivíduos submetidos a HSCT: influência dos polimorfismos A) *miR-101 rs7536540* e B) *miR-101 rs12375841*

4.3. Influência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* na sobrevivência global a 1 ano após HSCT

Relativamente à análise da sobrevivência global a 1 ano quanto aos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841*, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência (Figura 16). Não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre os genótipos dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* e a média para a sobrevivência ($P=0,891$ e $P=0,162$, respetivamente).

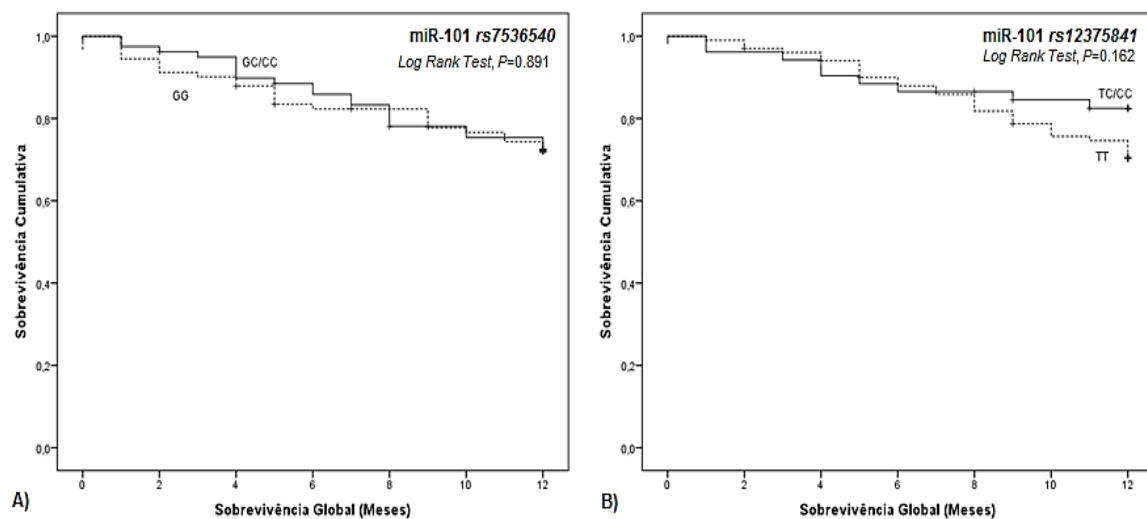


Figura 16 - Curvas de Sobrevivência de Kaplan-Meier e teste *Log Rank* relativas à sobrevivência global a 1 ano de indivíduos submetidos a HSCT: influência dos polimorfismos A) *miR-101 rs7536540* e B) *miR-101 rs12375841*

4.4. Influência da infecção por HCMV na sobrevivência global de indivíduos submetidos a HSCT

A Figura 17, mostra a sobrevivência global e respectivas curvas de *Kaplan-Meier* após o transplante de acordo com *status de infecção* por HCMV. Verificou-se que não existe qualquer associação estatisticamente significativa entre a presença de infecção ativa por HCMV e a média para a sobrevivência global, que foi de 44,8 meses para os indivíduos HCMV negativos e de 43,2 meses para os indivíduos que apresentavam infecção ativa por HCMV ($P= 0,144$).

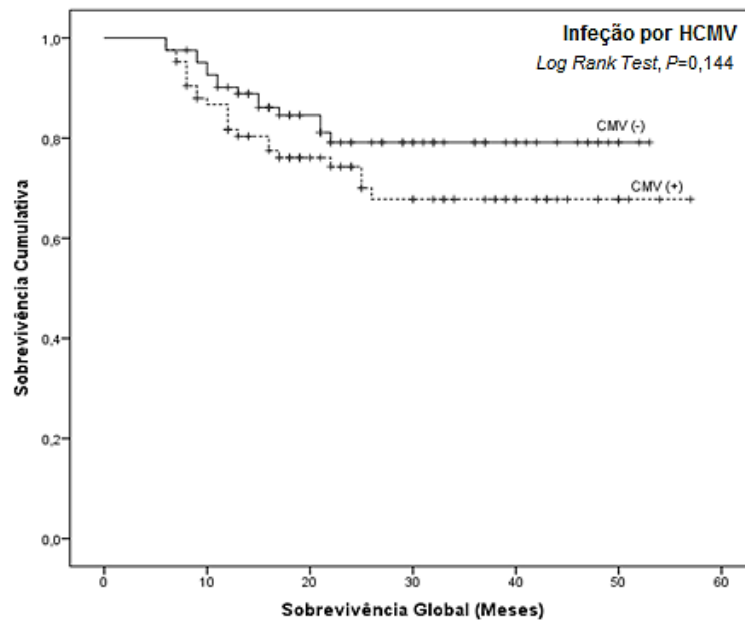


Figura 17 - Curvas de Sobrevivência global de *Kaplan-Meier* e teste *Log Rank* de indivíduos submetidos a HSCT: influência da infecção por HCMV

No que concerne à análise da sobrevivência global a 1 ano dos indivíduos submetidos a HSCT, verificou-se que a infecção ativa por HCMV influencia o tempo de sobrevivência global (Figura 18). Os indivíduos positivos para a presença de infecção ativa por HCMV apresentam um tempo de sobrevivência inferior comparativamente aos indivíduos HCMV negativos (9,9 versus 10,7 meses) (teste *Log Rank*, $P=0,020$).

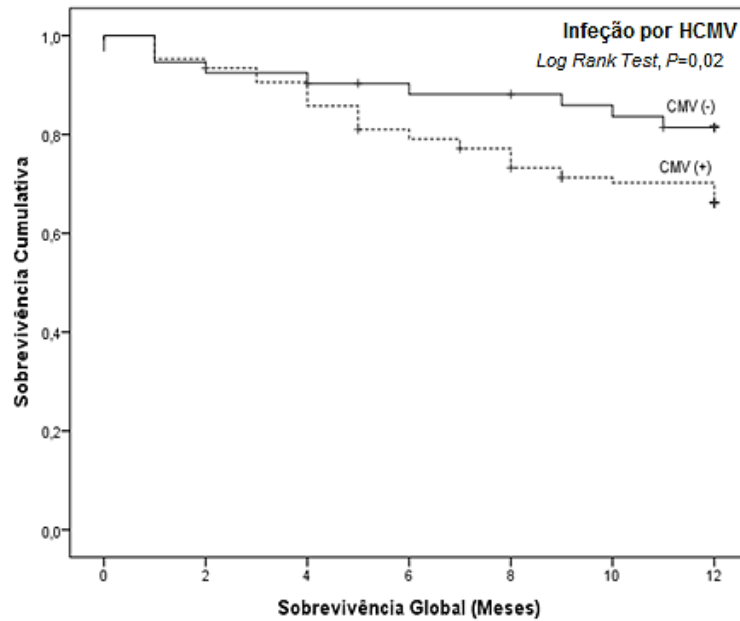


Figura 18 - Curvas de Sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste *Log Rank* relativas à sobrevivência global a 1 ano de indivíduos submetidos a HSCT: influência da infecção por HCMV

4.5. Influência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* na biodisponibilidade do miR-101

Na figura 19 e 20 encontram-se representados os gráficos relativos à expressão relativa do miR-101 no grupo controlo de forma a analisar a influência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* na biodisponibilidade do miRNA em estudo.

No caso do polimorfismo *miR-101 rs7536540*, apesar de não se observar diferenças estatisticamente significativas, verifica-se uma ligeira tendência para a diminuição dos níveis de expressão do miR-101 nos indivíduos portadores do genótipo CC comparativamente aos indivíduos homocigóticos GG ($\text{miR-101: } 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 0,47$, $P=0,058$).

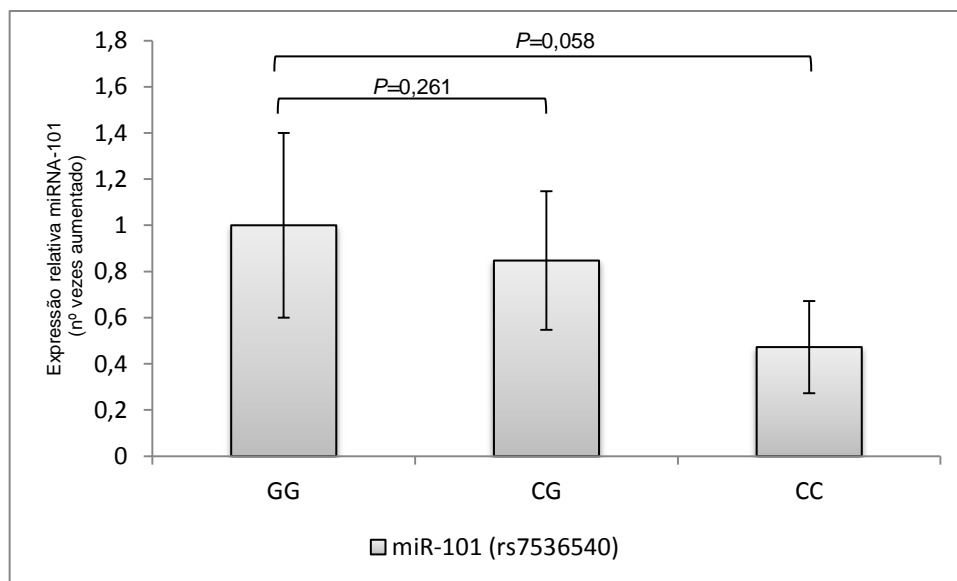


Figura 19 - Níveis de expressão relativa do miR-101 em indivíduos do grupo controlo: influência do polimorfismo *miR-101 rs7536540*.

Relativamente aos níveis de expressão do miR-101, verifica-se diferenças estatisticamente significativas na expressão deste consoante o polimorfismo genético *miR-101 rs12375841*. Os indivíduos homozigóticos CC apresentam um aumento de 2,43 vezes da expressão deste miRNA comparativamente aos indivíduos portadores do genótipo TT ($2^{-\Delta\Delta CT} = 2,43$, $P=0,040$).

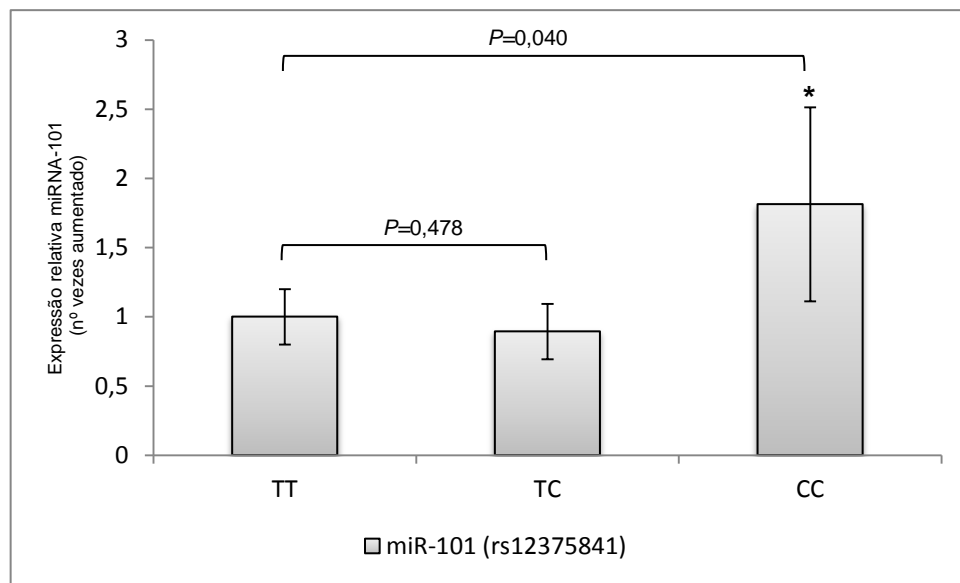


Figura 20 - Níveis de expressão relativa do miR-101 em indivíduos do grupo controlo: influência do polimorfismo *miR-101 rs12375841* (* $P<0,050$).



5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem-se verificado um crescente interesse e investimento pela área da Oncologia, em especial na definição de biomarcadores moleculares de risco e preditivos do desenvolvimento e *outcome* de patologias oncológicas. Efetivamente, a identificação de polimorfismos genéticos funcionais que influenciam a ativação de vias de sinalização moduladoras da dinâmica celular, permite uma melhor compreensão dos processos moleculares envolvidos nas diversas patologias, tornando-se numa ferramenta de auxílio na área de diagnóstico e terapêutica.

Na área das células estaminais, apesar dos diversos desenvolvimentos verificados nos últimos anos, ainda permanece uma área enigmática com diversas questões por esclarecer. Um dos maiores problemas centra-se na compreensão dos diversos mecanismos moleculares moduladores da dinâmica destas células. A capacidade de manter um *pool* celular e uma hematopoiese normal constitui um fator de extrema importância para a manutenção de uma homeostasia das HSCs, principalmente quando se trata de indivíduos sujeitos a HSCT. Este facto determinará se o transplante será bem-sucedido, o que constitui uma hipótese de cura para o doente.

A via PI3K-AKT-mTOR é uma via de sinalização que desempenha um papel fundamental no controlo da proliferação e diferenciação celular, contribuindo para a homeostasia dos sistemas biológicos celulares. Diversos estudos já demonstraram o envolvimento desta via de sinalização no controlo da homeostasia das HSCs [25, 46]. A atenuação da ativação do PI3K é essencial para a preservação do estado de quiescência das HSCs e da capacidade de autorrenovação a longo termo [23, 30]. Foi demonstrado que a deleção do *PTEN* resulta no desenvolvimento de uma neoplasia mieloproliferativa precoce e agressiva, acompanhada por um aumento da frequência de ciclo das HSCs [44, 45]. Por outro lado, verificou-se que a inibição de mTOR pela rapamicina é capaz de reverter muitos dos fenótipos associados com a deficiência de PTEN, incluindo o aumento da taxa de proliferação das HSCs [44]. Este facto sugere que normalmente o PTEN impede a entrada em ciclo celular das HSCs, através da inibição da sinalização a *downstream* de mTOR.

Os miRNAs têm sido definidos como uma nova classe de genes reguladores de diversos processos celulares, como a proliferação e diferenciação celular e o controlo do ciclo celular, através da regulação da expressão genética [58]. Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento destes pequenos RNAs no controlo da biologia das células estaminais da medula óssea [48]. A manipulação dos níveis de miRNA das células estaminais/progenitoras leva a alterações das propriedades celulares e da diferenciação,

o que sugere um papel fundamental dos miRNAs no controlo da diferenciação e da função das células estaminais da medula óssea [48].

Investigações envolvendo o miR-101 relataram a sua função em várias atividades celulares, como a proliferação celular, a diferenciação, invasão e apoptose. Análises bioinformáticas permitiram identificar a mTOR como um dos alvos do miR-101, tendo como consequência funcional a inibição do metabolismo, da proliferação e da sobrevivência celular [41, 76].

A ocorrência de polimorfismos genéticos nos genes de miRNAs tem sido associada à modulação do processamento dos miRNAs levando a alteração dos seus níveis de expressão. Devido ao envolvimento dos miRNAs na regulação de diversas cascatas de sinalização, a desregulação destes favorece a ativação ou a inibição das vias por eles reguladas. A identificação de variantes genéticas funcionais que alterem a função do miR-101 e que consequentemente alterem a ativação da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, poderá abrir caminho para a identificação de miRNAs que sirvam como biomarcadores moleculares preditivos do *outcome* do HSCT.

5.1. Influência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540/miR-101 rs12375841* e da infecção por HCMV na sobrevivência global após HSCT

Diversos estudos têm demonstrado a relevância e o impacto funcional que os SNPs nos genes codificadores dos miRNAs podem apresentar no desenvolvimento de diversas patologias [77]. Estudos anteriores revelaram que o miR-101 está relacionado com a replicação do vírus Herpes *simplex* (HSV) -1, tendo como alvo a proteína ATP5B [78]. Smits e colaboradores verificaram que o miR-101 se encontra sub-expresso nos gliomas induzindo assim a sobreexpressão de EZH2 [79]. No cancro da próstata e em casos de doença metastática em diversos cancros verificou-se a sub-expressão do miR-101-2, sugerindo um papel importante deste miRNA como supressor tumoral [62, 80].

O estudo desenvolvido por Bae e os seus colaboradores demonstrou recentemente que os polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* na sequência do miR-101 estão correlacionados com o desenvolvimento de cirrose hepática e posterior desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, e com a clearance da infecção por HBV, respetivamente [75].

De acordo com os resultados observados, verificámos que as frequências genóticas dos dois polimorfismos são semelhantes às obtidas no estudo realizado por Bae, numa população asiática, no qual estudou a associação destes polimorfismos ao risco de desenvolvimento de doença hepática associada ao vírus HBV [75]. Adicionalmente, as frequências observadas estão também em concordância com as indicadas na base de dados de SNPs do NCBI.

Quanto ao polimorfismo *miR-101 rs12375841* na população em estudo revelou que este polimorfismo condiciona a sobrevivência global dos indivíduos submetidos a HSCT alogénico ($P=0,011$). Contudo, a análise do polimorfismo *miR-101 rs7536540*, não se verificou nenhuma associação estatisticamente significativa entre este e a sobrevivência global (45,5 meses vs. 42,1 meses, $P=0,698$).

Estes resultados parecem indicar a existência de um efeito protetor associado ao alelo C nos doentes submetidos a HSCT, que se manifesta com o aumento do tempo médio de sobrevivência dos indivíduos portadores dos genótipos TC/CC.

Tal como já foi referido, a literatura sugere que presença de SNPs nos genes codificadores de miRNAs pode afetar a função dos miRNA de três formas: em primeiro lugar, através da alteração da transcrição do transcrito primário; segundo, através da alteração do processamento do pri-miRNA e pré-miRNA; e em terceiro, por alterações da interação miRNA-mRNA [74]. Estudos prévios propõem que os SNPs localizados na

sequência de pri-miRNAs e pré-miRNAs têm como consequências funcionais a alteração do processamento e, conseqüentemente, dos níveis de miRNA maduro. Por exemplo, estudos anteriores verificaram que o SNP *rs2910164* localizado na sequência do pré-miR-146a reduz tanto a quantidade do pré-miRNA como a do miR-146a maduro, devido, aparentemente, à alteração do processamento pela DROSHA/DGCR8 [81, 82]. Noutro estudo foi relatado que o SNP *rs11614913* no miR-196a2 maduro está associado com a diminuição significativa taxa de sobrevivência de indivíduos com cancro do pulmão de células não-pequenas, sugerindo ainda a associação deste SNP com um aumento do processamento do miRNA maduro [83]. Em conformidade ao anteriormente descrito, verificámos na população normal que o genótipo CC, relativo ao polimorfismo *miR-101 rs12375841*, está associado a um aumento de expressão do miR-101, verificando-se que os indivíduos portadores do genótipo CC apresentam um aumento de 2,43 vezes da expressão de miR-101 comparativamente aos indivíduos portadores do genótipo TT ($2^{\Delta\Delta CT} = 2,43$, $P=0,040$). Quando ao polimorfismo *miR-101 rs7536540* observámos uma tendência para níveis de expressão diminuídos do miR-101 nos indivíduos portadores do genótipo CC ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,47$, $P=0,058$).

As diferenças nos níveis de expressão observadas poderão dever-se à localização polimorfismo *miR-101 rs12375841* numa região flanqueadora do pré-miRNA. As regiões flanqueadoras dos pré-miRNAs proporcionam o ambiente ideal para a formação correta da estrutura do pri-miRNA e o seu reconhecimento por parte do complexo DROSHA/DGCR8 [84, 85]. Neste caso, esta variante poderá estar associada a uma configuração mais estável com a enzima DROSHA, culminando no aumento do processamento e dos níveis de expressão do miR-101.

O miR-101 tem sido associado à regulação de diversas atividades celulares, incluindo a proliferação celular, invasão e apoptose, devido à diversidade de alvos que possui [86]. De entre os inúmeros alvos destaca-se a proteína mTOR, que está envolvida na regulação da proliferação celular. Portanto, o miR-101 tem a função de regular os níveis de expressão da proteína mTOR através da sua ligação à região 3'UTR do mRNA codificador de mTOR [70].

Diversos estudos evidenciaram o papel da via PI3K/mTOR na regulação da proliferação das HSCs [25]. Estudos recentes permitiram demonstrar que o aumento da atividade de mTOR, quer por perda de função de elementos inibitórios, como PTEN e TSC1, quer por ganho de função do AKT, resultam no aumento da proliferação e, a longo prazo, à exaustão das HSCs [42, 87].

Dado que o miR-101 é um inibidor da proteína mTOR, alterações nos níveis deste miRNA refletir-se-ão na atividade desta. Deste modo, os indivíduos portadores dos genótipos CC, por apresentarem maior expressão do miR-101, poderão apresentar uma maior inibição de mTOR. Assim, colocamos a hipótese que os indivíduos portadores do genótipo CC apresentam uma maior capacidade de supressão da expressão de mTOR, o que poderá contribuir para uma maior atenuação da via PI3K/mTOR, e conseqüentemente, uma proliferação mais controlada das HSCs. Por conseguinte, estes indivíduos serão capazes de manter um *pool* de HSCs, que é responsável por manter os níveis homeostáticos das células hematopoiéticas, favorecendo em última análise o *outcome* do HSCT.

Apesar do progresso considerável na gestão das complicações do transplante, as infecções por HCMV continuam a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade durante o período de pancitopenia no pós-transplante, particularmente em indivíduos seropositivos para HCMV antes do transplante, observando-se uma taxa de reativação de 60-70% [88, 89]. Embora a proporção de mortes por infecção após o transplante tenha diminuído ao longo das últimas duas décadas, ainda há muito a ser feito de forma a diminuir ainda mais esse risco e implementar estratégias preventivas e profiláticas mais eficientes adaptadas a esta população de alto risco. De acordo com os resultados do nosso estudo, constatámos que a infecção ativa por HCMV não influencia a sobrevivência global dos indivíduos transplantados ($P= 0,144$).

5.2. Influência dos polimorfismos *miR-101 rs7536540/miR-101 rs12375841* e da infecção por HCMV na sobrevivência global a um ano após HSCT

De acordo com as evidências, a presença dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* não condiciona a sobrevivência global a 1 ano (*short-term survival*) e o sucesso do HSCT, não se verificando qualquer correlação com o tempo médio de vida dos indivíduos submetidos a este procedimento ($P=0.89$ e $P=0,162$).

De um modo geral, atendendo aos resultados obtidos, pode admitir-se que a presença de polimorfismos estudados na sequência do *miR-101* terá essencialmente uma consequência a longo prazo, verificando-se apenas a sua influência na sobrevivência global dos indivíduos a partir do sexto mês após o transplante (*long-term survival*).

O HSCT oferece um modelo único de reconstituição imune gradual que permite ilustrar a relação entre o tipo de deficiência imunológica e a ocorrência de infecção por determinados agentes patogénicos [90]. Após o transplante alogénico a sequência de infeções pode ser dividida em três períodos: 1) o primeiro é a fase aplásica que se segue ao regime preparatório até à recuperação neutrófila da medula doada, onde predominam as infeções bacterianas e fúngicas (*Aspergillus*); 2) o segundo, entre o enxerto da medula até ao quarto mês, é caracterizado pela deficiência da imunidade mediada por células, predominando as infeções virais (HCMV e adenovírus); 3) o terceiro período, a partir do quarto mês, é caracterizado pela deficiência em imunoglobulinas (IgG2) provocando a diminuição da resposta a antígenos de polissacarídeos das bactérias encapsuladas (*S. pneumoniae* e *H. influenzae*) [90, 91]. De acordo com os resultados do nosso estudo, verificámos que a infeção ativa por HCMV tem especial relevância nos primeiros 12 meses após o HSCT, sendo a principal responsável pela diminuição do tempo de sobrevivência dos doentes transplantados. O tempo de sobrevivência global a 1 ano diminui significativamente para os indivíduos com infeção ativa por HCMV comparativamente aos indivíduos HCMV negativos ($P=0,020$).

Deste modo, admite-se que a presença de infeções, neste caso por HCMV, desempenhará um papel fundamental essencialmente na sobrevivência a curto prazo dos doentes submetidos HSCT, não se verificando a mesma correlação a longo prazo.

De uma maneira geral, os resultados obtidos neste estudo permitem propor que nos primeiros 12 meses após transplante, a infeção por HCMV é o principal modulador da sobrevivência dos indivíduos submetidos a HSCT, sendo um fator preditivo de mau prognóstico. Por conseguinte, durante este período o indivíduo transplantado deve ser

monitorizado regularmente de forma a permitir uma intervenção terapêutica antecipada. Por outro lado, a partir do sexto mês após o transplante, o *outcome* do HSCT é essencialmente influenciado por fatores inerentes ao *background* genético individual. A presença do polimorfismo *miR-101 rs12375841* constitui um fator preditivo do *outcome* clínico dos indivíduos ao transplante. Assim, a caracterização molecular dos indivíduos, poderá possibilitar a definição de um modelo integrativo que permita um *follow-up* dos doentes mais eficiente, através da identificação de subgrupos que poderão beneficiar de terapias dirigidas (Figura 21).

A definição de um modelo integrativo constitui uma estratégia útil para um *follow-up* dos doentes submetidos a HSCT mais eficiente proporcionando assim uma medicina mais personalizada no tratamento de neoplasias hematológicas.

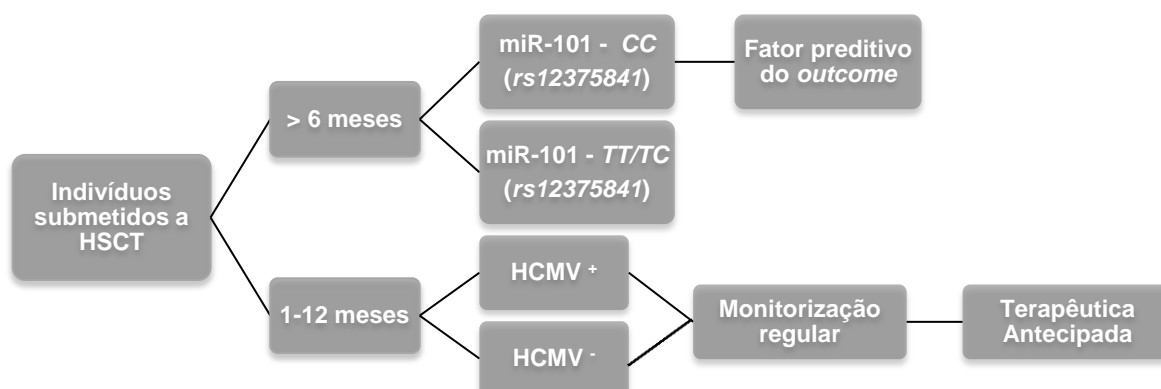


Figura 21 - Modelo de *follow-up* de indivíduos submetidos a HSCT, proposto com base nos resultados obtidos no presente estudo.



6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Ao longo dos últimos anos, o cancro tem-se destacado como uma das principais causas de morte em todo mundo, e de acordo com projeções da WHO, é expectável a nível mundial que o número de novos casos e de mortes por cancro duplique nos próximos vinte a trinta anos. Deste modo, é essencial delinear novas abordagens de investigação com o objetivo de melhorar a área da medicina personalizada oncológica.

O desenvolvimento do HSCT só foi possível através de umnexo entre três áreas de investigação promissoras: terapias envolvendo células estaminais, técnicas imunomoduladoras, e da individualização das terapêuticas oncológicas. Até hoje, este procedimento continua a ser a única forma de terapia com células estaminais que está amplamente disponível. No passado, o transplante constituía um procedimento de alto risco que estava reservado para doentes jovens, sem comorbilidades. No entanto, ao longo dos anos tem havido uma redução constante na mortalidade relacionada com este tratamento. Este facto evidencia os desenvolvimentos já obtidos nesta área visto que se verificou, simultaneamente, um aumento da idade média dos doentes submetidos ao transplante.

A área das células estaminais continua a ser um quebra-cabeças, ainda com muitos enigmas por desvendar, principalmente a nível dos diversos mecanismos moleculares responsáveis pelo controlo destas células. A via PI3K-AKT-mTOR foi associada ao controlo da homeostasia das HSCs, estando envolvida na regulação da divisão celular e na manutenção de um pool de células estaminais. A ocorrência de alterações que favoreçam a ativação desta via de sinalização potencia a proliferação descontrolada das HSCs, culminando na exaustão destas células.

Um dos moduladores moleculares da via PI3K-AKT-mTOR é o miR-101, que é responsável pela inibição de mTOR. Oscilações na expressão do miR-101, em consequência da ocorrência de SNPs funcionais, podem contribuir para a ocorrência de desequilíbrios celulares. A descoberta dos miRNAs como uma nova classe de moléculas reguladoras de diversos processos celulares, torna-os um alvo desejável de estudo em diversas áreas. Os miRNAs têm sido associados ao desenvolvimento de diversas patologias, tendo já sido definidos como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, com impacto na sobrevivência global e na resposta a tratamentos.

De acordo com os resultados, os indivíduos portadores da variante genética miR-101-CC/TC (*rs12375841*) apresentam níveis de expressão do miR-101 mais elevados e melhor sobrevivência global, o que evidencia possíveis oscilações na ativação da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR moduladas pelo background genético do indivíduo. Contudo, não verificámos qualquer tipo de influência deste polimorfismo na sobrevivência

global a 1 ano dos indivíduos submetidos a HSCT, o que parece suportar a hipótese de um efeito tardio associado à variante CC no *outcome* do HSCT.

Em consequência da potencial interação dos miRNAs, a análise combinada de outros miRNAs envolvidos na biologia das HSCs, poderá ser uma estratégia promissora para a definição de um perfil de biomarcadores com maior especificidade e sensibilidade preditivos do *outcome* clínico do HSCT. Assim, a caracterização molecular dos indivíduos poderá ser uma estratégia útil para a definição de um modelo integrativo que permita um *follow-up* dos doentes mais acurado tendo em conta a extensa rede de vias de sinalização envolvida no controlo da homeostasia da HSCs.

Por outro lado, observámos que as infeções oportunistas, neste caso as infeções por HCMV, continuam a ter um papel fundamental na determinação do sucesso do transplante, influenciando a sobrevivência dos indivíduos principalmente nos primeiros 12 meses após este procedimento.

Como objetivo futuro pretende-se replicar o presente estudo numa nova amostragem com um número superior de casos, de forma a validar os resultados obtidos. Estudos futuros passarão por analisar os polimorfismos em termos funcionais, através da realização de ensaios funcionais, com o objetivo de avaliar a consequência funcional dos polimorfismos *miR-101 rs7536540* e *miR-101 rs12375841* na expressão do miRNA, e pela confirmação do envolvimento de mTOR através da quantificação do mRNA de mTOR ou avaliação da expressão da proteína mTOR por *Western Blot*.



7. BIBLIOGRAFIA

1. Werner, H.M., G.B. Mills, and P.T. Ram, *Cancer Systems Biology: a peek into the future of patient care?* Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(3): p. 167-76.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
4. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. , *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase 2013*, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2012 v1.0.
5. Vecchio, L., et al., *Importance of epigenetic changes in cancer etiology, pathogenesis, clinical profiling, and treatment: what can be learned from hematologic malignancies?* Biochim Biophys Acta, 2013. **1836**(1): p. 90-104.
6. Warr, M.R., E.M. Pietras, and E. Passegue, *Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2011. **3**(6): p. 681-701.
7. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2006. **354**(17): p. 1813-26.
8. Passweg, J.R., et al., *Hematopoietic stem cell transplantation: a review and recommendations for follow-up care for the general practitioner*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13696.
9. Jenq, R.R. and M.R. van den Brink, *Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(3): p. 213-21.
10. Mohty, B. and M. Mohty, *Long-term complications and side effects after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an update*. Blood Cancer J, 2011. **1**(4): p. e16.
11. Basara, N., et al., *Reduced intensity preparative regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience*. Bone Marrow Transplant, 2002. **30**(10): p. 651-9.
12. Champlin, R., et al., *Nonmyeloablative preparative regimens for allogeneic hematopoietic transplantation. Biology and current indications*. Oncology (Williston Park), 2003. **17**(1): p. 94-100; discussion 103-7.
13. Marr, K.A., *Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenge*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 265-70.
14. Ramaprasad, C. and K.J. Pursell, *Infectious complications of stem cell transplantation*. Cancer Treat Res, 2014. **161**: p. 351-70.
15. Tomtishen, J.P., 3rd, *Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28)*. Virol J, 2012. **9**: p. 22.
16. Vanarsdall, A.L. and D.C. Johnson, *Human cytomegalovirus entry into cells*. Current Opinion in Virology, 2012. **2**(1): p. 37-42.
17. Revello, M.G. and G. Gerna, *Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications*. Reviews in Medical Virology, 2010. **20**(3): p. 136-155.
18. Streblow, D.N., S.L. Orloff, and J.A. Nelson, *Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(5): p. 577-82.
19. Smith, C. and R. Khanna, *Immune Regulation of Human Herpesviruses and Its Implications for Human Transplantation*. American Journal of Transplantation, 2013. **13**(s3): p. 9-23.
20. Noriega, V., et al., *Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus*. Immunologic Research, 2012. **54**(1-3): p. 140-151.

21. Stosor, V. and T.R. Zembower, *Infectious complications in cancer patients*. Cancer treatment and research, . x, 511 pages.
22. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
23. Suda, T., F. Arai, and A. Hirao, *Hematopoietic stem cells and their niche*. Trends Immunol, 2005. **26**(8): p. 426-33.
24. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 93-106.
25. Ito, K. and T. Suda, *Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(4): p. 243-56.
26. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
27. Rossi, L., et al., *Hematopoietic stem cell characterization and isolation*. Methods Mol Biol, 2011. **750**: p. 47-59.
28. Copley, M.R. and C.J. Eaves, *Developmental changes in hematopoietic stem cell properties*. Exp Mol Med, 2013. **45**: p. e55.
29. Orford, K.W. and D.T. Scadden, *Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 115-28.
30. Cheung, T.H. and T.A. Rando, *Molecular regulation of stem cell quiescence*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(6): p. 329-40.
31. Renstrom, J., et al., *How the niche regulates hematopoietic stem cells*. Chem Biol Interact, 2010. **184**(1-2): p. 7-15.
32. Ding, L. and S.J. Morrison, *Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches*. Nature, 2013. **495**(7440): p. 231-5.
33. Silberstein, L.E. and C.P. Lin, *A new image of the hematopoietic stem cell vascular niche*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(5): p. 514-6.
34. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-93.
35. Benjamin, D., et al., *Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(11): p. 868-80.
36. Yang, H., et al., *mTOR kinase structure, mechanism and regulation*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 217-23.
37. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.
38. Dibble, C.C. and B.D. Manning, *Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(6): p. 555-64.
39. Faivre, S., G. Kroemer, and E. Raymond, *Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(8): p. 671-88.
40. Shimobayashi, M. and M.N. Hall, *Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 155-62.
41. Chen, C., et al., *TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2397-408.
42. Kharas, M.G., et al., *Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice*. Blood, 2010. **115**(7): p. 1406-15.
43. Juntilla, M.M., et al., *AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species*. Blood, 2010. **115**(20): p. 4030-8.
44. Yilmaz, O.H., et al., *Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 475-82.

45. Zhang, J., et al., *PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 518-22.
46. Lee, J.Y., et al., *mTOR activation induces tumor suppressors that inhibit leukemogenesis and deplete hematopoietic stem cells after Pten deletion*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 593-605.
47. Kohli, L. and E. Passegue, *Surviving change: the metabolic journey of hematopoietic stem cells*. Trends Cell Biol, 2014.
48. Havelange, V. and R. Garzon, *MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis*. Am J Hematol, 2010. **85**(12): p. 935-42.
49. Ivey, K.N. and D. Srivastava, *MicroRNAs as Regulators of Differentiation and Cell Fate Decisions*. Cell Stem Cell. **7**(1): p. 36-41.
50. Gambari, R., et al., *Targeting microRNAs involved in human diseases: a novel approach for modification of gene expression and drug development*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(10): p. 1416-29.
51. Winter, J., et al., *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 228-34.
52. Finnegan, E.F. and A.E. Pasquinelli, *MicroRNA biogenesis: regulating the regulators*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013. **48**(1): p. 51-68.
53. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597-610.
54. Pereira, D.M., et al., *Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics*. Drug Discovery Today, 2013. **18**(5-6): p. 282-289.
55. Wahid, F., et al., *MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(11): p. 1231-43.
56. Ameres, S.L. and P.D. Zamore, *Diversifying microRNA sequence and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(8): p. 475-88.
57. Di Leva, G., M. Garofalo, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 287-314.
58. Inui, M., G. Martello, and S. Piccolo, *MicroRNA control of signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 252-63.
59. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. Genes Dev, 2002. **16**(6): p. 720-8.
60. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10a): p. 1902-10.
61. Su, H., et al., *MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity*. Cancer Res, 2009. **69**(3): p. 1135-42.
62. Varambally, S., et al., *Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer*. Science, 2008. **322**(5908): p. 1695-9.
63. Ren, G., et al., *Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(12): p. 3091-104.
64. Wang, H.J., et al., *MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion*. Eur J Cancer, 2010. **46**(12): p. 2295-303.
65. Haiart, S., et al., *MicroRNA-196a & microRNA-101 expression in Barrett's oesophagus in patients with medically and surgically treated gastro-oesophageal reflux*. BMC Res Notes, 2011. **4**: p. 41.
66. Zhang, J.G., et al., *MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(4): p. 671-8.

67. Friedman, J.M., et al., *The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2623-9.
68. Frankel, L.B., et al., *microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy*. *Embo j*, 2011. **30**(22): p. 4628-41.
69. Zhu, Q.Y., et al., *MicroRNA-101 targets MAPK phosphatase-1 to regulate the activation of MAPKs in macrophages*. *J Immunol*, 2010. **185**(12): p. 7435-42.
70. Chen, K., et al., *MicroRNA-101 mediates the suppressive effect of laminar shear stress on mTOR expression in vascular endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **427**(1): p. 138-42.
71. Jin, Y. and C.G. Lee, *Single Nucleotide Polymorphisms Associated with MicroRNA Regulation*. *Biomolecules*, 2013. **3**(2): p. 287-302.
72. Brookes, A.J., *The essence of SNPs*. *Gene*, 1999. **234**(2): p. 177-86.
73. Knudsen, L.E., S.H. Loft, and H. Autrup, *Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man*. *Mutat Res*, 2001. **482**(1-2): p. 83-8.
74. Ryan, B.M., A.I. Robles, and C.C. Harris, *Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(6): p. 389-402.
75. Bae, J.S., et al., *Association study of genetic variations in microRNAs with the risk of hepatitis B-related liver diseases*. *Dig Liver Dis*, 2012. **44**(10): p. 849-54.
76. Wang, F.Z., et al., *Human cytomegalovirus infection alters the expression of cellular microRNA species that affect its replication*. *J Virol*, 2008. **82**(18): p. 9065-74.
77. Gong, J., et al., *Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis*. *Human Mutation*, 2012. **33**(1): p. 254-263.
78. Zheng, S.Q., et al., *MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B*. *Antiviral Res*, 2011. **89**(3): p. 219-26.
79. Smits, M., et al., *miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis*. *Oncotarget*, 2010. **1**(8): p. 710-20.
80. Chiang, C.W., et al., *PKCalpha mediated induction of miR-101 in human hepatoma HepG2 cells*. *J Biomed Sci*, 2010. **17**: p. 35.
81. Hu, Z., et al., *Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women*. *Hum Mutat*, 2009. **30**(1): p. 79-84.
82. Shen, J., et al., *A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(10): p. 1963-6.
83. Hu, Z., et al., *Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(7): p. 2600-8.
84. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(30): p. 27595-603.
85. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. *Cell*, 2006. **125**(5): p. 887-901.
86. Gui, T. and K. Shen, *miRNA-101: A potential target for tumor therapy*. *Cancer Epidemiology*, 2012. **36**(6): p. 537-540.
87. Huang, J., et al., *Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways*. *Nat Med*, 2012. **18**(12): p. 1778-85.
88. Boeckh, M. and P. Ljungman, *How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients*. *Blood*, 2009. **113**(23): p. 5711-9.
89. Gratwohl, A., et al., *Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time*. *Bone Marrow Transplant*, 2005. **36**(9): p. 757-69.

90. McCann, S., et al., *Outbreaks of infectious diseases in stem cell transplant units: a silent cause of death for patients and transplant programmes*. Bone Marrow Transplant, 2004. **33**(5): p. 519-29.
91. Tomblyn, M., et al., *Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(10): p. 1143-238.

