

## **A relação dos miRNA-15-a e 16-1 na Leucemia Linfocítica Crônica, e a utilização da engenharia biomédica no diagnóstico: Uma abordagem da medicina translacional**

### **The relationship of miRNA-15-a and 16-1 in Chronic Lymphocytic Leukemia, and the use of biomedical engineering in diagnosis: A translational medicine approach**

DOI:10.34117/bjdv7n3-226

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

#### **Jéssica Camila Marcolongo**

Biomédica pela UNIMAR – Universidade de Marília

Endereço: Rua Frei Jacinto n. 113 – Apt. 302. Marília-SP, Bairro: Fragata

E-mail: paulocezarnovais@yahoo.com.br

#### **Paulo Cezar Novais**

Doutor em Ciências Médicas pela FMRP-USP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Docente do Programa de Mestrado em Interações Estruturais e Funcionais na Reabilitação, da UNIMAR - Universidade de Marília

Endereço: Rua Frei Jacinto n. 113 – Apt. 302. Marília-SP, Bairro: Fragata

E-mail: paulocezarnovais@yahoo.com.br

#### **RESUMO**

A leucemia linfocítica crônica (LLC) o tipo mais comum entre adultos no mundo ocidental, surge de um clone maligno de células B e pouco se sabe a respeito do seu início e progressão. Vários fatores que podem predizer o curso clínico foram identificados, onde as células leucêmicas têm pouca ou nenhuma mutação no gene da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (IgVH). A deleção que mais ocorre no DNA genômico em LLC é no cromossomo 13q13, esta deleção é evidente em cerca de 50 por cento dos casos e está associada ao longo intervalo entre o diagnóstico e a necessidade de tratamento. A deleção 13q13 é geralmente a única anormalidade em LLC e alguns tipos de câncer, evidenciando patogenicidade para o gene excluído. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNAs não codificantes, com cerca de 19 a 25 nucleotídeos que atuam na regulação gênica e estão intimamente ligados a diversas patologias como a diabetes, doenças neurodegenerativas e o câncer. Os miRNAs-15-a e 16-1, encontrados na menor região da exclusão em 13q13, são frequentemente excluídos ou regulados negativamente na LLC. A perda destes miRNAs resulta no aumento de expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2. O gene BCL2 anti-apoptótico é hiperexpresso em células B da LLC, com isso é possível identificar que é alvo dos miRNAs 15-a e miR-16-1 e que sua regulação negativa desencadeia a apoptose. Este estudo teve como objetivo analisar a relação dos miRNAs 15-a e 16-1 com a LLC. A pesquisa da literatura foi realizada considerando os preceitos de utilização dos materiais para o desenvolvimento da pesquisa; embasada em artigos de revisão sistemática, relatos de casos e artigos originais, utilizou-se como base de dados, Medline, Scielo, PubMed, Annual Reviews, Elsevier. De acordo com a análise realizada neste estudo, podemos

concluir que os miRNAs 15-a e 16-1, pró-apoptóticos, encontram-se hipoexpressos na Leucemia Linfocítica Crônica.

**Palavras-chave:** Apoptose, Câncer, Leucemia Linfocítica Crônica, Medicina Translacional, miRNA.

## ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) the most common type among adults in the Western world, arises from a malignant B-cell clone and little is known about its onset and progression. Several factors that may predict the clinical course have been identified, where leukemic cells have little or no mutation in the immunoglobulin heavy chain variable region (IgVH) gene. The most commonly occurring deletion in genomic DNA in LLC is on chromosome 13q13, this deletion is evident in about 50 percent of cases and is associated with the long interval between diagnosis and the need for treatment. The 13q13 deletion is usually the only abnormality in LLC and some cancers, evidencing pathogenicity for the deleted gene. The miRNAs are small non-coding RNA molecules of about 19 to 25 nucleotides that act in gene regulation and are closely linked to several pathologies such as diabetes, neurodegenerative diseases, and cancer. The miRNAs-15-a and 16-1, found in the smallest deletion region at 13q13, are frequently deleted or negatively regulated in LLC. Loss of these miRNAs results in increased expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2. The anti-apoptotic BCL2 gene is overexpressed in LLC B cells, with this it can be identified that it is targeted by miRNAs 15-a and miR-16-1 and that its negative regulation triggers apoptosis. This study aimed to analyze the relationship of miRNAs 15-a and 16-1 with LLC. The literature search was carried out considering the precepts of the use of materials for the development of the research; based on systematic review articles, case reports and original articles, Medline, Scielo, PubMed, Annual Reviews, Elsevier were used as databases. According to the analysis performed in this study, we can conclude that the pro-apoptotic miRNAs 15-a and 16-1 are hypoexpressed in Chronic Lymphocytic Leukemia.

**Keywords:** Apoptosis, Cancer, Chronic Lymphocytic Leukemia, Translational Medicine, miRNA.

## 1 INTRODUÇÃO

### *Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)*

A leucemia linfocítica crônica (LLC), o tipo mais comum entre adultos no mundo ocidental, surge de um clone maligno de células B e pouco se sabe a respeito do seu início e progressão<sup>1</sup>. Vários fatores que podem predizer o curso clínico foram identificados, onde as células leucêmicas têm pouca ou nenhuma mutação no gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina IgVH<sup>2-4</sup>.

As alterações genômicas da LLC também são preditores independentes da progressão da doença e sobrevivência, apesar do avanço da ciência no campo do estudo do genoma dos glioblastomas as associações moleculares são amplamente desconhecidas<sup>5,6</sup>.

A deleção que mais ocorre no DNA genômico em LLC é no cromossomo 13q13, esta deleção é evidente em cerca de 50% dos casos e está associada ao longo intervalo entre o diagnóstico e a necessidade de tratamento<sup>1,7,8</sup>.

A deleção 13q13 é geralmente a única anormalidade em LLC e alguns tipos de câncer, evidenciando patogenicidade para o gene excluído. Sabe-se que existem dois membros de uma classe de pequenos RNAs não codificantes ou miRNAs, miR-15-a e miR-16-1, encontrados na menor região da exclusão em 13q13, frequentemente excluídos ou regulados negativamente na LLC<sup>1,4,9</sup>.

### *MicroRNAs*

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes, com cerca de 19 a 25 nucleotídeos, transcritos de sequência de DNA em miRNAs primários (pri-miRNAs) e processados em miRNAs precursores (pré-miRNAs) e miRNAs maduros<sup>10-12</sup>. Tem mostrado íntima relação na ativação e expressão genica, estudos recentes apontam que miRNAs são transportados entre diferentes compartimentos subcelulares para controlar a taxa de tradução e em algumas afetando a transcrição<sup>10-12</sup>.

Os miRNAs encontram-se intimamente envolvidos com uma variedade de patologias, como as doenças neurodegenerativas, processos inflamatórios, diabetes e até mesmo o câncer<sup>14,15</sup>. Esses processos que contribuem para o desenvolvimento de patologias podem ocorrer pela perda ou regulação negativa da expressão de miRNA devido a mutação, inativação epigenética, hiper ou hipo expressão ou regulação negativa da transcrição<sup>11,16</sup>.

Os miRNAs são de suma importância para a formação e evolução animal, envolvidos na grande diversidade de processos biológicos, quando hiper expressos causam uma desordem gênica associando-os à diversas patologias<sup>5,7,17</sup>. São de livre circulação em fluídos extracelulares sendo relatados como biomarcadores para uma grande variedade de doenças, tem como uma das funções, mediar a sinalização celular<sup>18,19</sup>. Quando em intervenções vírus-hospedeiro, não apenas miRNAs virais evoluíram para regular os genes do hospedeiro em seu benefício, mas também apareceram os miRNAs que podem ser direcionados por miRNAs expressos constitutivamente nas células alvo do vírus<sup>20,21</sup>.

Aproximadamente metade de todos os miRNAs identificados atualmente são intragênicos e processados principalmente de íntrons apresentando poucos éxons de genes que codificam proteínas, a outra parte são intergênicos com transcrição independente de um gene hospedeiro e regulados por seus próprios promotores. Podem ser transcritos,

algumas vezes, como uma longa transcrição chamada de clusters na qual pode haver regiões semelhantes, neste caso, são considerados uma família<sup>7,13,22</sup>. O miRNA possui vias classificadas como canônicas e não canônicas<sup>22</sup>.

#### *As vias do miRNA*

A via não canônica pode ter várias ramificações em vias independentes de Drosha/DGCR8 e independentes de DICER<sup>13,23</sup>. Os pré-miRNAs se originam de via independente Drosha/ DGCR8 sendo semelhante a substrato Dicer, estes são processados por Drosha a partir de transcrições de RNA (shRNA) endógeno<sup>13,23</sup>. Necessitam que o AGO2 complete sua maturação dentro do citoplasma, pois são de comprimento insuficiente para serem substratos Dicer, com isso promove o transporte do pré-miRNA em fatias AGO2 e AGO2 dependente de cadeia 3p. O corte de 3'-5' do fio de 5p completa sua maturação<sup>13,23,24</sup>.

Vias canônicas tem papel fundamental onde os miRNAs são processados, no qual os pri-miRNAs são transcritos de seus genes e transformadas em pré-miRNAs pelo complexo de microprocessadores, complexo esse que consiste de uma proteína ligada RNA Di George Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) e uma enzima ribonuclease III, Drosha. Formados, os miRNAs, são exportados para o citoplasma por um complexo exportin 5 (XPO)/RanGTP sendo processados pela enzima endonuclease RNase III<sup>1,23,25</sup>. O processamento ocorre para promover a remoção do laço terminal, resultando assim em um duplex maduro. Com a formação da cadeia a direção determina o nome da forma do miRNA maduro<sup>1,13</sup>.

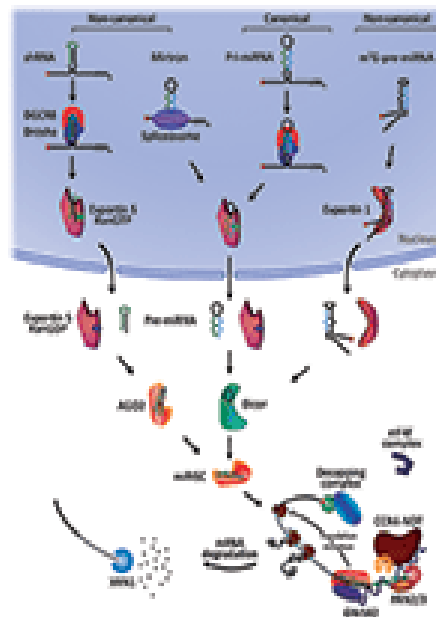
A regulação gênica transcricional e pós-transcricional do miRNA dentro do núcleo ocorre através do miRISC, localizado, que possui a função de regular as taxas do processo e associa a eucromatina em gene loci com transcrição ativa, mesmo com estudos atuais a atuação dos miRNAs no núcleo ainda é limitada<sup>13,20</sup>.

O miRISC de baixo peso molecular tem ação de interação com miRNAs dentro do núcleo e induz a degradação do mRNA nuclear, mecanismo esse que ainda está sendo estudado para ser melhor compreendido. Sabe-se ainda que o miRISC pode regular a transcrição diretamente, dados recentes revelam que o AGO2 estava concentrado no núcleo de fibroblastos senesced interagindo com miRISC e retinoblastoma para suprimir a transcrição de genes promotores de proliferação<sup>18,24,26</sup>

Os miRNAs possuem interação com o loci genômico, onde o RNA derivado (eRNA) é transcrito aumentando os níveis de mRNA de genes adjacentes, estimulando a cromatina transcricional ativa alterando perfis alternativos de emenda do RNA<sup>13</sup>.

Mesmo recente, dados atuais sugerem que o miRISC pode estar envolvido ao processo de compactação da cromatina nuclear, mediando a remodelação genômica<sup>27</sup>.

Figura 1. A biogênese miRNA canônica começa com a geração da transcrição pri-miRNA. O complexo de microprocessadores, composto por Drosha e Síndrome de DiGeorge/Critical Region 8 (DGCR8), corta o pri-miRNA para produzir o precursor-miRNA (pré-miRNA). O pré-miRNA é exportado para o citoplasma de forma dependente de Exportin5/RanGTP e processado para produzir o duplex miRNA maduro. Finalmente, ou os fios de 5p ou 3p do miRNA duplex maduro são carregados na família de proteínas Argonaute (AGO) para formar um complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC). Nas vias não canônicas, o RNA de pequenos pinos de cabelo (shRNA) é inicialmente cortado pelo complexo de microprocessadores e exportado para o citoplasma via Exportin5/RanGTP. Eles são processados através de ago2-dependente, mas dicer-independente, decote. Mirtrons e 7-metilguanina tampadas ( $m^7G$ )-pré-miRNA dependem de Dicer para completar sua maturação citoplasmática, mas eles diferem em seu shuttling nucleocitoplasmático. Mirtrons são exportados via Exportin5/RanGTP enquanto  $m^7G$ -pré-miRNA são exportados via Exportin1. Todos os caminhos levam, em última análise, a um complexo funcional miRISC. Na maioria dos casos, o miRISC se liga aos mRNAs-alvo para induzir a inibição translacional, provavelmente interferindo com o complexo eIF4F. Em seguida, as proteínas familiares GW182 ligadas a Argonaute recrutam os poli(A)-deadenylases PAN2/3 e CCR4-NOT. O PAN2/3 inicia a enenucleação enquanto o complexo CCR4-NOT completa o processo, levando à remoção do  $m^7$ Tampa G no mRNA alvo pelo complexo de descapping. O mRNA decapped pode então sofrer degradação de 5'-3' através da exorxonuclease XRN1. Modificado a partir de O'Brien, J. et al<sup>22</sup>.



Vários estudos tem mostrado que miRNAs tem ligação em uma sequência específica no UTR de 3' de seus mRNAs alvo, induzindo a repressão translacional de mRNA. Embora tenha relatos de que miRNAs inibem a expressão gênica, a ativação translacional mediada por miRNA pode estar envolvida também na regulação da expressão<sup>22,28</sup>.

miRISC foi detectado em vários locais subcelulares, no núcleo é enriquecido em locais de transcrição ativa podendo interagir como DNA o que pode promover estados de cromatina ativa ou inativa<sup>23</sup>. Pode interagir também com o mRNA nascente para promover perfis de emendas mais eficientes ou diferentes do loci inicial.<sup>23,29</sup> O miRISC citoplasmático pode difundir todo o citosol ou sofrer shuttling.<sup>23,26</sup> Dentro do citosol ele se associa com polissomas inibindo a tradução, pode promover a desregulação na função do mRNA e a ativação translacional. Já no retículo endoplasmático rugoso o miRISC tem interação com o mRNA para inibir a tradução<sup>23</sup>.

Localizado em corpos de processamento transitório e livres de membranas, pode mediar a inibição translacional e armazenamento ou decomposição do mRNA<sup>20</sup>. Em algumas condições, pode estressar os grânulos para armazenamento ou degradação, variando de acordo com o estímulo, pode ser encontrado também em mitocôndrias provendo a ativação translacional ou inibição.<sup>2,30</sup> A localização do miRISC dentro do Golgi ocorre pela secreção de vesículas, podendo ser reciclado pelo citosol ou transportado para o meio extracelular mediando a comunicação da célula.<sup>18,23,31</sup>

O miRNA pode regular as redes genéticas de forma transitória ou dinamicamente, por feedback e loops de alimentação que produzem uma regulação constante ao longo da diferenciação que por força maior podem se propagar ocasionando mudanças nos perfis transcricionais promovendo a expressão genética estável no processo de transcrição<sup>32,33</sup>.

A partir de uma visão global, o miRNA a nível celular ainda está sob intensa investigação, devido suas funcionalidades e interações em alvos específicos podendo desempenhar papéis importantes da redução da expressão gênica<sup>22</sup>.

#### *A relação do miRNAs e a LLC*

Estudos revelam que as células LLC (B CD5+) tem um comportamento específico na expressão de miRNA diferenciando as células B CD5+ de células normais<sup>1,6,9</sup>. A investigação de forma clínica deste padrão pode mostrar se a expressão de genes de miRNA está associada com fatores que influenciam na causa e curso clínico da LLC<sup>6,8,16</sup>

A regulação negativa de miRNAs é um fenômeno comum em cânceres, aqui temos o exemplo dos miR-15a e miR-16-1 que se encontram regulados negativamente na leucemia linfocítica crônica e que possuem como alvo o gene antiapoptótico BCL2<sup>1,34</sup>.

Alguns miRNAs da família humana let-7 podem ser perdidos em tumores sólidos, ocasionando a expressão descontrolada de seus alvos, incluindo o oncogene Ras, que promove o crescimento do tumor<sup>23,27</sup>.

A hiper expressão de um miRNA pode ocorrer devido a ampliação do gene ou mutações em sua região promotora, ou ainda como consequência da transcrição que ocorre na regulação positiva resultando em hiperexpressão do gene alvo. A hiperexpressão de miRNAs oncogênicos, conhecidos como ONCOMIRS, pode levar a supressão de genes de tumor contribuindo para o aumento da sobrevivência e proliferação de células tumorais<sup>16,32</sup>. Um exemplo seria na hiperexpressão de miR-155, miR-21 e o cluster miR-92, presentes em tumores sólidos e leucemias<sup>27,35</sup>.

É possível identificar diversos polimorfismos que resultam na criação ou interrupção de um sítio de ligação de miRNA, sugerindo que possa haver interferência de forma relevante em muitos estados da doença<sup>2,26</sup>. Sob o efeito de algumas variantes pode ser que ocasionem diferenças fenotípicas entre os seres humanos e contribuir para causa de doenças comuns<sup>22,26</sup>. A investigação de SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) nos genes alvos de miRNAs, pode ser um próximo campo de pesquisa que tenha por objetivo explorar genes de doenças comuns<sup>34,36,37</sup>

Pesquisas intensivas tem se concentrado em investigar seus papéis no sistema imunológico, estes estudos têm revelado que diferentes órgãos hematopoiéticos e linhagens de células possuem expressão de miRNA diferentes, que em conjuntos específicos, o desenvolvimento da célula imune pode ser regulado dinamicamente<sup>15,26,37</sup>.

Os miRNAs estão envolvidos na regulação de resposta imune adquirida e inata, além da hematopoiese, evidenciando o quão importante é seu papel no desenvolvimento de células imunológicas<sup>38,39</sup>.

A auto renovação das células troncos, o envelhecimento e a proliferação das células cancerosas são regulados por redes comuns de proto-oncogenes e supressores de tumor, enquanto supressores de tumor mantêm o equilíbrio e regulam negativamente a auto renovação promovendo o envelhecimento de células tronco<sup>24,25,30</sup>. À medida que os organismos envelhecem, o dano ao DNA se acumula e os telômeros se desgastam, ativando supressores de tumor para manter o equilíbrio e reduzir a função das células tronco e da capacidade de regeneração dos tecidos<sup>40,41</sup>. O dano ao DNA também pode ativar oncogenes e inativar supressores de tumor, interrompendo o equilíbrio nas vias de atividade que ocasionam o câncer<sup>7,36,42</sup>.

MicroRNAs analisados por métodos de microship mostram que células de LLC possui redução na expressão de miR-15-a e miR-16-1 quando comparados com células CD5+ normais, mostrando também uma deleção monoalélica em 13q13<sup>1,43</sup>. Estudos

mostram que esta redução significativa pode estar associada na expressão de certos miRNAs e expressão de ZAP-70, mutação que ocorre na IgVH<sup>4,8</sup>.

Assim sendo este dado provavelmente influencia intimamente no diagnóstico inicial até o tratamento propriamente dito, fator importante quando associado á atividade da doença, uma vez que a terapia para LLC geralmente é suspensa até que os sintomas, doença avançada ou ambos se desenvolvam<sup>6,16</sup>. Acredita-se que a expressão de miRNA pode ser incluída nos marcadores como prognóstico positivo para LLC<sup>9,18</sup>. A assinatura do miRNA encontrada pode ser de suma importância para a compreensão da patogênese da LLC<sup>34,43</sup>.

Fatores importantes ressaltam a funcionalidade dos miRNAs como fortes candidatos a biomarcadores, possuem uma assinatura ativa na transcrição do RNA mensageiro evidenciando sua expressão anormal na LLC, como a hipoexpressão dos miR-15-a e miR-16-1<sup>1,9,22</sup>. Este comportamento sugere um mecanismo de regulação gênica, diferenciando o prognóstico da doença, onde os miR-15-a e miR-16-1 tem comportamento supressor de tumor, se hiperexpressos, portanto, a mutação patogênica que ocorre, sugere fortemente que estes estão envolvidos na LLC<sup>4,44</sup>

O gene BCL2 anti-apoptótico é híper expresso em células B da LLC, com isso é possível identificar que é alvo dos miR-15-a e miR-16-1 e que, sua regulação positiva, impede a apoptose<sup>1,16,34</sup>.

Estudos realizados identificaram, na análise de todo genoma, a assinatura de 13 miRNAs consistindo em miRNA-15-a, miR-195, miR221, miR23b, miR-155, miR-223, miR-29 a-2, miR-24-1, miR-29b-2, miR-146, miR-16-1, miR-16-2 e miR-29c, capaz de diferenciar casos de LLC com hipoexpressão de AZP70 daqueles com hiperexpressão de ZAP70, e casos de LLC com IGVH não mutado daqueles com IGVH30 mutado<sup>4,6,8,16</sup>.

Alguns miRNAs desta assinatura puderam ser confirmados, a hiperexpressão de miR-15-a, 31, 32 e miR-1631 e a hipo expressão de miR-29-a, 31 e miR-29-b, 33, 34 foram associados a IGVH não mutado e níveis diminuídos de miR-29-c, 32, 33-c, 35-c, 36 e miR-22332, 33, 35 e 37 como estando associados com IGVH não mutado e com hiperexpressão de ZAP70, CD38 e B2M. Um miRNA é relatado como marcador de mau prognóstico, o miR-150, estudos relatam que ele geralmente é regulado negativamente em pacientes com mau prognóstico<sup>4,8,24</sup>.

Diversos estudos mostram que os miRNAs podem ser liberados em fluídos extracelulares podendo assim ser utilizados como biomarcadores para uma grande variedade de doenças, incluindo a LLC<sup>9,19,26</sup>.



São detectados em amostras de plasma, soro, fluido cefalorraquidiano, saliva, leite materno, urina, lágrimas, colostro, fluido peritônio, fluido brônquico, fluido seminal e até em fluido folicular ovariano<sup>8,22</sup>.

Alguns miRNAs extracelulares são considerados subprodutos de atividades celulares, como ocorre no processo de lesão celular ou morte, atualmente há evidências de que essa liberação esteja envolvida em metástase de alguns tipos de cânceres<sup>27,45,46</sup>.

#### *A engenharia biomédica no diagnóstico da LLC*

A assinatura de miRNA está associada à progressão da doença em LLC, onde mutações em genes alvo de miRNAs possuem importância funcional para o prognóstico<sup>9,16</sup>.

Desde sua descoberta na década de 1990, existem progressos importantes sobre como ocorre a produção intracelular dos miRNAs e como eles exercem efeitos regulatórios sobre a expressão gênica, envolvendo diversos processos fisiológicos e patológicos<sup>2,22</sup>. Podemos dizer que estamos mais próximos de entender seu funcionamento como um todo no organismo humano através das novas tecnologias, deixando claro que são poderosos reguladores genéticos, e que seus efeitos regulatórios sobre a transcrição ainda são, na grande maioria, desconhecidos<sup>36,47</sup>.

Condições sob as quais os miRNAs estimulam ativação translacional precisam de maiores investigações, a dinâmica das ações do miRNA revela tamanha complexidade no processo de regulação genética no qual a engenharia biomédica possui um papel importante<sup>17,48</sup>.

Recentemente houve um avanço que impacta muito o campo de análise dos miRNAs, onde é possível ver o movimento de miRNA púnico ou mRNA através de resolução espacial e temporal, ajudando a entender a dinâmica complexa. Envolvendo modelos matemáticos poderosos, sistemas sofisticados de software, unindo a área biomédica e a engenharia<sup>18,48</sup>.

Podemos dizer então que os miRNAs exercem papel não apenas de biomarcadores para doenças, que também desempenham papel importante na comunicação celular, regulando a atividade de células hospedeiras<sup>16,26,32</sup>.

O mecanismo pelos quais os miRNAs são secretados e tomados pelas células ainda são incompreendidos e requerem uma investigação mais profunda<sup>9,22</sup>.

Segundo a CMS (Centros de Serviços Medicare & Medicaid), agência do departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, promover a medicina personalizada inovadora para pacientes com câncer é uma oportunidade para o desenvolvimento de teste

avançados de laboratório de diagnóstico, utilizando o seqüenciamento de próxima geração (NGS), em quadros de metástase, recaídas, refratário ou estágio III ou IV<sup>18,49</sup>. Acredita-se que com essa nova linha de testes de diagnósticos seja possível identificar pacientes com certas mutações genéticas ministrando tratamentos mais precoces<sup>36,37</sup>. Além disso, com testes específicos e reconhecida a mutação, podem direcionar os pacientes para candidatura de testes clínicos do câncer<sup>18,37</sup>.

Um dos mais interessantes desenvolvimentos no tratamento do câncer tem sido a identificação de assinaturas que podem ser direcionadas por agentes terapêuticos específicos, chamada de oncologia de precisão tem sido utilizada a alguns anos<sup>17,18,36</sup>. O perfil molecular do tumor usando tecnologias MPS está sendo aplicada à terapias em cânceres que apresentam resistência<sup>9,36</sup>.

Muitos genes variantes podem conduzir a oncogênese, os ensaios em MPS são a maneira mais eficiente de traçar o perfil de tumores para orientar intervenções terapêuticas<sup>36,48</sup>. Abordagem esta que ainda está no início, demonstra sucesso no diagnóstico para diversos tipos de cânceres e tem levado a aprovação de terapias direcionadas molecularmente<sup>46,48</sup>. O perfil do tumor geralmente fornece informações restritas ao tumor, podendo produzir informações genéticas da linha germinativa que pode ser relevante ao paciente<sup>18,48</sup>.

Estudos mostram que o programa PGx pode ser implementado usando uma nomenclatura idiossincrática (sistema de alelos em estrela) funcionando bem em laboratórios de ciências básica, pode apresentar problemática em clínicas devido seu entendimento confuso para médicos<sup>18,35</sup>.

Diante desta problemática inicial, o programa PGx tem investido grandemente para desenvolver uma apresentação padrão de resultados e descritores clínicos que facilitem a interpretação das informações PGx. Permite interfaces eletrônicas entre laboratório e sistemas de informação clínica, permitindo a apresentação just-in-time no ponto de atendimento<sup>18,36</sup>.

Os esforços agora se voltam para padronização dos descritores de fenótipo clínico, o que reduz a barreira de implementação e com isso espera-se diminuir a necessidade de análise manual de variantes<sup>18,48</sup>.

A introdução de MPS ao diagnóstico, particularmente de axioma, tem tido resultados positivos na resposta precoce na descoberta de doenças agudas tendo grande impacto sobre a gestão clínica<sup>17</sup>. Tem sido usado em número crescente em doenças como a cardiomiopatia, doença renal, imunodeficiência primária e doença neuromuscular<sup>18,36</sup>. A

questão principal é que o MPS é utilizado no contexto de testes genéticos já existente na clínica há décadas, usado para testes específicos podendo variar na aplicação<sup>36</sup>.

O processo de padronização otimiza a coleta e processamento de amostras, seqüenciamento e interpretação, apresentando diferenças significativas na taxa de diagnóstico<sup>17</sup>. Mais estudos são necessários para confirmar estes importantes parâmetros<sup>17,18</sup>.

A análise de MPS é realizada e um pipeline de bioinformática padronizado é usado, incluindo várias abordagens o que torna o método confiável através de dois componentes abrangentes: alinhamento e chamada de variantes de sequência e interpretação das consequências funcionais das variantes da sequência<sup>18,20</sup>. O pipeline é otimizado para descoberta de doenças mendelianas usando dados de heranças específicos, variantes causais que devem ter três critérios: co-segregação da doença consistente com o modo de herança, ocorrência rara (frequência de alelo menos de  $\leq 0,1\%$  em populações relevantes), e impacto funcional previsto no produto do gene<sup>17,18</sup>.

O uso de MPS para triagem populacional ainda não foi implementado como serviço clínico, método mais apropriado, já que existem várias perguntas sem respostas sobre sua aplicação neste cenário<sup>17,36,48</sup>. Como por exemplo, quais associações gene - doença devem ser rastreadas? Se um programa de triagem populacional incluir alguma intervenção que altere o manejo de uma condição? Dado que a baixa probabilidade prévia de doença aumenta o risco de falso positivo, quão conservador deve ser a interpretação desta variante? Quais são as evidências que apóiam a ideia de que essa abordagem irá melhorar os resultados de saúde? Quais riscos no erro a interpretação irão resultar em cuidados inadequados? Como a análise será atualizada à medida que novos conhecimentos forem acumulados? Implementações de MPS em ambientes de pesquisa clínica permitirão estudos que explorem essas e outras questões para determinar se pode ser implantado para rastreamento populacional<sup>17,18,37,48</sup>.

Atualmente as aplicações genômicas de nível 1 são definidas pelo Escritório de Genômica de Saúde Pública (OPHG) do CDC como aquelas com potencial significativo e de impacto positivo na saúde pública mundial, com base em diretrizes e recomendações disponíveis baseadas em evidências. Existe uma lista de aplicações de nível 1, onde são listados teste genômicos de histórico familiar de saúde da família<sup>17,36</sup>. Cerca de 2 milhões de pessoas no EUA estão em risco aumentado para desfechos adversos à saúde porque tem mutações genéticas que os predispõem a seguinte condição<sup>17,18</sup>.

O método proposto de análise de MPS permite a detecção e intervenção precoce o que poderia reduzir significativamente a morbidade e mortalidade, aumentando a linha de pesquisa nesse campo para fornecer maior entendimento aos profissionais da ciência de forma geral<sup>17,18,36,48</sup>.

## **2 OBJETIVO**

Analisar a relação dos miRNAs 15-a e 16-1 apoptóticos, na Leuemia Linfocítica Crônica.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A busca literária foi realizada através de pesquisa em artigos de revisão sistemática, relatos de casos e artigos originais, utilizou-se como base de dados, Medline, Scielo, PubMed, Annual Reviews, Elsevier.

## **4 CONCLUSÃO**

De acordo com a análise realizada em nosso estudo, concluímos que os miRNAs 15-a e 16-1, estão hipoexpressos na Leucemia Linfocítica Crônica.

## REFERÊNCIAS

1. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(24):15524-15529. doi:10.1073/pnas.242606799
2. Sonkoly E, Pivarsci A. Advances in microRNAs: Implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(1):24-38. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00534.x
3. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(5):1516-1521. doi:10.1073/pnas.0707493105
4. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 353(17):1793-1801. doi:10.1056/nejmoa050995
5. Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Glioblastoma: From molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014; 9:1-25. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130324
6. Volinia S, Galasso M, Costinean S, et al. Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res*. 2010; 20(5):589-599. doi:10.1101/gr.098046.109
7. Giovannetti E, Erozeenci A, Smit J, Danesi R, Peters GJ. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012; 81(2):103-122. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.03.010
8. Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia*. 2015; 29(5):1004-1017. doi:10.1038/leu.2014.351
9. Van Roosbroeck K, Calin GA. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia: MiRacle or miRage for prognosis and targeted therapies? *Semin Oncol*. 2016; 43(2):209-214. doi:10.1053/j.seminoncol.2016.02.015
10. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science* 2004; 303(5654):83-86. doi:10.1126/science.1091903
11. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014; 9(September 2013):287-314. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104715
12. Bushati N, Cohen SM. MicroRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23:175-205. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406
13. Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007; 26(3):775-783. doi:10.1038/sj.emboj.7601512
14. Waterstrat A, Van Zant G. Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor

- cells. *Curr Opin Immunol.* 2009 ;21(4):408-413. doi:10.1016/j.coi.2009.05.002
15. Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol.* 2008; 29(7):343-351. doi:10.1016/j.it.2008.04.004
16. Nadeu F, Diaz-Navarro A, Delgado J, Puente XS, Campo E. Genomic and Epigenomic Alterations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2020; 15:149-177. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032810
17. Brown NA, Elenitoba-Johnson KSJ. Enabling Precision Oncology through Precision Diagnostics. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2020; 15:97-121. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012735
18. Doherty GJ, Petruzzelli M, Beddowes E, Ahmad SS, Caldas C, Gilbertson RJ. Cancer treatment in the genomic era. *Annu Rev Biochem.* 2019; 88:247-280. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-011840
19. Andrade F, Nakata A, Gotoh N, Fujita A. Large miRNA survival analysis reveals a prognostic four-biomarker signature for triple negative breast cancer. *Genet Mol Biol.* 2020; 43(1):1-11. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2018-0269
20. Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 ;20(2):214-221. doi:10.1016/j.ceb.2008.01.006
21. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature.* 2007; 449(7164):919-922. doi:10.1038/nature06205
22. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; 9(AUG):1-12. doi:10.3389/fendo.2018.00402
23. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* 2006; 20(16):2202-2207. doi:10.1101/gad.1444406
24. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2015; 4(9):e252. doi:10.1038/mtna.2015.23
25. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res.* 2007; 100(8):1164-1173. doi:10.1161/01.RES.0000265065.26744.17
26. Johanson TM, Skinner JPJ, Kumar A, Zhan Y, Lew AM, Chong MMW. The role of microRNAs in lymphopoiesis. *Int J Hematol.* 2014; 100(3). doi:10.1007/s12185-014-1606-y
27. Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, et al. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res.* 2011; 71(13):4443-4453.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0608

28. Tagne JB, Mohtar OR, Campbell JD, et al. Transcription factor and microRNA interactions in lung cells: An inhibitory link between NK2 homeobox 1, miR-200c and the developmental and oncogenic factors Nfib and Myb. *Respir Res.* 2015; 16(1):1-11. doi:10.1186/s12931-015-0186-6

29. Datta J, Kutay H, Nasser MW, et al. Methylation mediated silencing of microRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 2008; 68(13):5049-5058. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6655

30. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin Y V., et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* (80- ). 2007; 317(5845):1764-1767. doi:10.1126/science.1146067

31. Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res.* 2007; 67(4):1419-1423. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4074

32. Agami R. MicroRNAs, RNA binding proteins and cancer. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40(4):370-374. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02279.x

33. Berezikov E, Guryev V, Van De Belt J, Wienholds E, Plasterk RHA, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell.* 2005; 120(1):21-24. doi:10.1016/j.cell.2004.12.031

34. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2018 ;391(10129):1524-1537. doi:10.1016/S0140-6736(18)30422-7

35. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Illades-Aguiar B, Antonio Leyva-Vázquez M. miRNAs in Acute Lymphoblastic Leukemia: Diagnosis, Prognosis and Target Therapeutic. *Adv Hematol Malig.* Published online. 2019, 1-15. doi:10.5772/intechopen.84318

36. Shaw KRM, Maitra A. The Status and Impact of Clinical Tumor Genome Sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2019; 20:413-432. doi:10.1146/annurev-genom-083118-015034

37. Nazha A, Sekeres MA. Precision Medicine in Myelodysplastic Syndromes and Leukemias: Lessons from Sequential Mutations. *Annu Rev Med.* 2017; 68(August 2016):127-137. doi:10.1146/annurev-med-062915-095637

38. Tili E, Michaille JJ, Calin GA. Expression and function of micro RNAs in immune cells during normal or disease state. *Int J Med Sci.* 2008; 5(2):73-79. doi:10.7150/ijms.5.73

39. Sonkoly E, Stähle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(2):131-140. doi:10.1016/j.semcancer.2008.01.005

40. He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:377-406. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113248

41. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:675-699. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154
42. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6:457-478. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130230
43. García-Marco JA, Delgado J, Hernández-Rivas JA, et al. Update of the Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica clinical guidelines of the management of chronic lymphocytic leukemia. *Med Clin (Barc).* 2017;148(8):381.e1-381.e9. doi:10.1016/j.medcli.2016.12.030
44. Meister G. miRNAs Get an Early Start on Translational Silencing. *Cell.* 2007;131(1):25-28. doi:10.1016/j.cell.2007.09.021
45. Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2016;11:47-76. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044438
46. Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;98:12-23. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.10.003
47. Mallick PK, Mohapatra SK, Chae GS, Mohanty MN. Convergent learning-based model for leukemia classification from gene expression. *Pers Ubiquitous Comput.* Published online 2020. doi:10.1007/s00779-020-01467-3
48. Williams MS. Early Lessons from the Implementation of Genomic Medicine Programs. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2019;20:389-411. doi:10.1146/annurev-genom-083118-014924
49. Huynh P-H, Nguyen V-H, Do T-N. Novel hybrid DCNN-SVM model for classifying RNA-sequencing gene expression data. *J Inf Telecommun.* 2019;3(4):533-547. doi:10.1080/24751839.2019.1660845