



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Juliana Ravelli Baldassarre Martins Celestino

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs EM PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
E MESILATO DE IMATINIBE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Prof^a Titular Célia Regina Nogueira

Coorientadora: Prof^a Dr^a Paula de Oliveira Montandon Hokama

Botucatu

2021

Juliana Ravelli Baldassarre Martins Celestino

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA E
MESILATO DE IMATINIBE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador (a): Prof^a Titular Célia Regina Nogueira
Coorientador(a): Prof^a Dr^a Paula de Oliveira Montandon Hokama

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Celestino, Juliana Ravelli Baldassarre Martins.

Perfil de expressão de microRNAs em pacientes com leucemia
mieloide crônica tratados com transplante de medula óssea e
mesilato de imatinibe / Juliana Ravelli Baldassarre Martins
Celestino. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Coorientador: Paula de Oliveira Montandon Hokama

Capes: 40101053

1. Leucemia mielóide - Doença crônica. 2. MicroRNAs.
3. Transplante de medula óssea. 4. Mesilato de Imatinibe.

Palavras-chave: Análise In Silico; Leucemia mieloide crônica;
Mesilato de Imatinibe; MicroRNAs; Transplante de medula óssea.

Dedicatória

A Deus, por todas as oportunidades e por colocar pessoas especiais em meu caminho que permitiram que este trabalho se tornasse realidade.

Aos meus queridos pais, pelo incentivo e força que me deram ao longo deste trabalho e em todos os momentos de minha vida.

Ao meu esposo, pessoa querida e especial, que me mostra todos os dias o real sentido da vida.

Agradecimentos

A *Deus*, pela oportunidade de realizar este trabalho e possibilitar a conclusão de mais uma conquista em minha vida.

Aos meus pais, *Ozília* e *Cláudio* pelo apoio, amor e incentivo ao longo de toda a minha vida que me permitiram realizar grandes sonhos, como a realização deste trabalho.

Ao meu irmão *Gustavo* por ser uma inspiração em minha vida e por todo incentivo e apoio.

Ao meu esposo *Anizio* pelo incentivo, companheirismo, serenidade e apoio que foram fundamentais para que eu pudesse concretizar este sonho. Agradeço muito também pela ajuda com os programas de informática e pela paciência em me ensinar.

À *Profª Drª Paula de Oliveira Montandon Hokama* pela oportunidade de poder participar deste trabalho, por todos os valiosos ensinamentos, pela paciência e orientação em todos os momentos que precisei. Agradeço muito pela generosidade e paz transmitidas em todas as nossas conversas. Guardarei sempre com muito carinho todas as lembranças dos momentos que convivemos e todo o aprendizado que me passou. Muito obrigada, de coração.

À *Profª Titular Célia Regina Nogueira* pela oportunidade, que foi essencial para que este trabalho se tornasse realidade. Agradeço muito pela disponibilidade e por me receber sempre com tanto carinho.

À Ms. Juliana Capanacci, Ms. Letícia Antunes Muniz Ferreira e à Ms. Juliane Dadalto que realizaram as análises iniciais que permitiram que este trabalho fosse realizado.

À Ms. Sarah Santiloni Cury e ao Dr. Leonardo Nazario de Moraes pela imensa ajuda nas análises de bioinformática, por toda paciência e disponibilidade em me ajudar.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Dr. Robson Carvalho e ao Dr. Leonardo Nazario de Moraes pelas correções e sugestões que muito contribuíram para este trabalho.

Aos funcionários da *Seção Técnica de Pós-Graduação* pela grande ajuda e eficiência.

Aos *professores das disciplinas da Pós-Graduação* que muito contribuíram para a minha formação e me inspiraram. Guardarei todos com muito carinho em meu coração.

Aos amigos de trabalho da *Agência Transfusional do Hemocentro de Botucatu* que me incentivaram e apoiaram durante este trabalho, permitindo que eu pudesse realizar meu sonho.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

Resumo

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes que pode ser dividida em três fases clínicas: crônica, acelerada e crise blástica. É causada por translocação entre os cromossomos 9 e 22 $t(9;22)(q34;q11)$ que gera o cromossomo Filadélfia, formando o rearranjo gênico BCR-ABL1 gerado através da fusão dos genes ABL e BCR. A LMC tem como tratamento os inibidores de tirosina quinase (ITQs), sendo que o mesilato de imatinibe é a droga de primeira escolha no Brasil. Apesar do sucesso da terapia com ITQs, o desenvolvimento de resistência ao tratamento ocorre em 10 a 15% dos pacientes, o que renovou o interesse na fisiopatologia da LMC, incluindo a função dos microRNAs (miRNAs) nesta doença. O objetivo deste trabalho foi encontrar um perfil de miRNAs e seus possíveis genes e vias alvos de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica – Fase Crônica (LMC-FC): recém diagnosticados sem tratamento (n=14) *versus* tratados com TCPH-alo (transplante de células progenitoras hematopoiéticas alogênico) (n=14) e tratados com TCPH-alo (n=14) *versus* tratados com mesilato de imatinibe (n=14). Análises de expressão foram realizadas para 758 miRNAs por RT-qPCR. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática para análises dos dados. Desta forma, foi possível encontrar um perfil de miRNAs e seus possíveis genes e vias alvos nos grupos estudados. Esses resultados fornecem uma base para estudos adicionais de miRNAs na LMC, que podem auxiliar no prognóstico da doença.

Palavras-Chave: Leucemia Mieloide Crônica, MicroRNAs, Análise In Silico, Transplante de Medula Óssea, Mesilato de Imatinibe

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a pluripotent hematopoietic stem cells myeloproliferative disease that is divided into three clinical phases: chronic, accelerated and blast crisis. The translocation between chromosomes 9 and 22t(9;22)(q34,q11) generates Philadelphia chromosome, forming BCR-ABL1 gene generated through the fusion of ABL and BCR genes. The CML treatment is tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and imatinib mesylate is the gold standard treatment in Brazil. Despite the success TKIs therapy, the resistance development occurs in 10 to 15% of patients, which has renewed interest in CML pathophysiology, including the microRNAs (miRNAs) role in CML. The objective was to find a miRNAs profile and their possible target genes and target pathways in CML-Chronic Phase patients (CML-CP): newly diagnosed without treatment (n=14) *versus* bone marrow transplantation (n=14) and bone marrow transplantation (n=14) *versus* imatinib mesylate (n=14). Expression analyzes were performed for 758 miRNAs by RT-qPCR. Bioinformatics tools were used for data analysis. It was possible to find a miRNAs profile and their target genes and target pathways in patients groups. These results provide a basis for further studies of CML and miRNAs, which may assist in CML prognosis.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, MicroRNAs, In Silico Analysis, Bone Marrow Transplantation, Imatinib Mesylate

Sumário

Capítulo 1 - Introdução Estendida

1. Introdução	13
1.1 Fases Clínicas da LMC.....	14
1.2 Tratamento.....	15
1.3 MicroRNAs	18
1.4 MicroRNAs e Câncer	21
1.5 Bioinformática	22
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. Referências	25

Capítulo 2 - Artigo Científico I

Resumo	32
Introdução	33
Pacientes e Métodos	33
Resultados.....	35
Discussão	36
Referências	41

Capítulo 3 - Artigo Científico II

Resumo	46
Introdução	47

Metodologia.....	49
Resultados.....	53
Discussão	62
Referências	66

Capítulo 4 - Conclusão.....73

ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética.....	76
ANEXO 2. Genes com alta expressão - Recém diagnosticados <i>versus</i> TCPH-alo	81
ANEXO 3. Genes com baixa expressão - Recém diagnosticados <i>versus</i> TCPH-alo.....	82
ANEXO 4. Genes expressos diferencialmente (alta expressão) no grupo de pacientes tratados com TCPH-alo óssea <i>versus</i> tratados com mesilato de imatinibe.....	84
ANEXO 5. Genes expressos diferencialmente (baixa expressão) no grupo de pacientes tratados com TCPH-alo <i>versus</i> tratados com mesilato de imatinibe.....	85

Capítulo 1
Introdução Estendida

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC), doença mieloproliferativa de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, é causada por uma translocação entre os cromossomos 9 e 22 $t(9;22)(q34;q11)$, que gera o cromossomo Filadélfia. Essa translocação resulta no rearranjo gênico BCR-ABL1, o qual é gerado através da fusão dos genes BCR e ABL (BENNOUR, et al, 2016; FERDINAND, et al, 2012).

No cromossomo Filadélfia, o gene de fusão BCR-ABL1 formado codifica uma proteína tirosina quinase cuja atividade é desregulada (SOVERINI, 2019). Esta desregulação leva à expansão clonal e quadro de hiperplasia da linhagem mieloide (COMERT, et al, 2013). A tirosina quinase se liga ao trifosfato de adenosina (ATP) e tranfere fosfato para resíduos de tirosina em proteínas específicas. Após as fosforilações, estas proteínas desempenham todas as atividades fundamentais de uma proteína quinase, porém, de forma anormal (AZEVEDO, 2017).

O rearranjo BCR-ABL1 pode codificar proteínas de diferentes tamanhos dependendo do ponto de interrupção no gene BCR. Três regiões de interrupção no gene BCR foram descritos: menor (mBCR), maior (M-BCR), presente em mais de 95% dos pacientes, e micro (μ -BCR) (CHASSERIAU, 2004).

O ponto de interrupção na região m-BCR resulta no transcrito e1a2 que é traduzida em uma proteína p190. Na região M-BCR, dois grandes pontos de interrupção podem ser encontrados: após o 13º éxon, resultando em e13a2 (b2a2) ou após o 14º éxon resultando em e14a2 (b3a2), sendo que ambos (e13a2 e e14a2) traduzem a proteína p210. É possível observar uma terceira proteína BCR-ABL1: p230, quando o ponto de quebra é na região micro (μ -BCR), resultando o transcrito e19a2 (CHASSERIAU, et al, 2004; DI STEFANO, et al, 2016) (**Figura 1**).

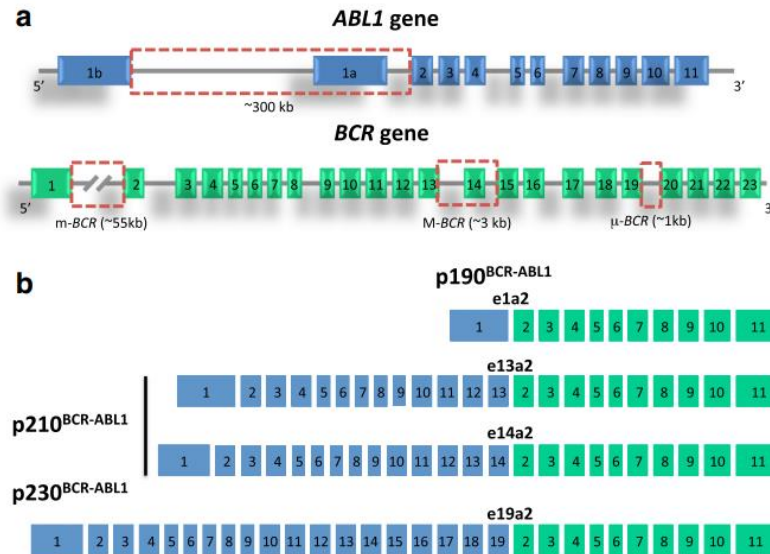


Figura 1. Pontos de interrupção nos genes BCR e ABL1 e seus transcritos. **a** Pontos de interrupção mais frequentes no BCR ocorrem no intron 1 (m-BCR), nos íntrons 13 ou 14 (M-BCR) ou no íntron 19 (μ-BCR). **b** Os transcritos mais comuns resultantes da translocação são: e1a2 resultante do m-BCR e traduzido na isoforma p190^{BCR-ABL1}; e13a2 e e14a2, resultantes do M-BCR, ambos traduzidos na isoforma p210^{BCR-ABL1}; e19a2 resultante do μ-BCR e traduzido na forma p230^{BCR-ABL1} (Adaptado de Soverini, 2018).

Em estudo realizado com 45.503 pacientes recém diagnosticados com LMC, observou-se que a proporção de e13a2 e de e14a2, incluindo os casos que co-expressam e13a2 e e14a2, foi de 37,9% e 62,1%, respectivamente. Os demais transcritos, considerados raros, foram encontrados em 1,93% dos pacientes (BACCARANI, et al, 2019).

1.1 Fases Clínicas da LMC

A LMC consiste em três fases clínicas. A primeira é a fase crônica, definida pelo aumento dos níveis de glóbulos brancos e também pela proliferação mielóide e maturação da medula óssea (ALADAĞ E, et al, 2019). Na fase crônica, os sintomas são: fadiga, fraqueza, dor abdominal, perda de peso, sudorese e esplenomegalia. Observa-se leucocitose nos exames de sangue periférico (hemograma), sendo encontrado no exame diferencial os seguintes granulócitos: mielócitos, mieloblastos e promielócitos. Na medula óssea ocorre intensa hiperplasia e fibrose (CHAUFFAILLE, 2011).

A segunda fase é a acelerada, para a qual a doença progride se não for tratada ou não responder ao tratamento (ALADAĞ E, et al, 2019). Esta fase caracteriza-se pelo aumento da esplenomegalia, aumento da quantidade de células blásticas, trombocitose, mielofibrose e resistência terapêutica. A terceira fase é a fase blástica, na qual ocorre refratariedade ao tratamento e o número de células blásticas é superior a 20% na medula óssea ou sangue periférico. A expectativa de vida é de três a seis meses após o início da crise blástica (CHAUFFAILLE, 2011).

1.2 Tratamento

A LMC tem como tratamento de primeira linha os inibidores de tirosina quinase (ITQs). Os três ITQs disponíveis comercialmente no Brasil para o tratamento da LMC incluem mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe. As diretrizes atuais apresentam as três opções para o gerenciamento inicial da LMC na fase crônica (JABBOUR, 2017).

O mesilato de imatinibe, cujo nome comercial é Glivec®, foi o primeiro ITQ a receber a aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de pacientes com LMC em fase crônica. Este medicamento inibe a ação da tirosina-quinase e reduz a quantidade do clone Ph positivo. O mesilato de imatinibe atua na porção efetora da oncoproteína BCR-ABL1. Liga-se no mesmo sítio no qual o ATP se ligaria na proteína BCR-ABL1, ocorrendo assim a interrupção dos sinais oncogénicos para o núcleo da célula, reduzindo a proliferação celular e induzindo os mecanismos apoptóticos (JABBOUR et al., 2009; HUGHES et al., 2009; KANTARJIAN et al., 2012) (**Figura 2**).

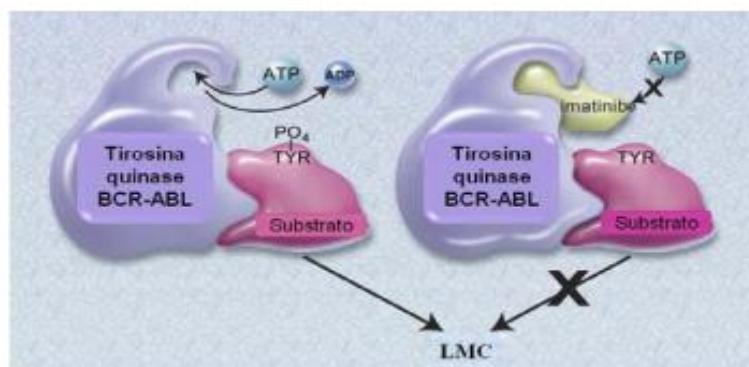


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do mesilato de imatinibe, o qual se liga no mesmo sítio em que o ATP se ligaria na proteína BCR-ABL1, ocorrendo, assim a interrupção dos sinais oncogénéticos para o núcleo da célula (Adaptado de Druker 2008).

O dasatinibe é um ITQ oral de segunda geração 350 vezes mais potente em relação ao imatinibe. Seu mecanismo de ação é inibir a família Src de quinases, importante no mecanismo de sinalização celular. O nilotinibe é um análogo estrutural do imatinibe. Sua afinidade pelo local de ligação do ATP no BCR-ABL1 é 30 a 50 vezes maior. Assim como o dasatinibe, o nilotinibe demonstrou inicialmente a capacidade de induzir respostas hematológicas e citogenéticas em pacientes com falha no uso de imatinibe (JABBOUR, 2017).

O advento dos ITQs revolucionou a terapia de LMC, que anteriormente era realizada apenas com transplante alogênico de células-tronco (Yeung, et al, 2016). Apesar de ser o único tratamento curativo para a LMC (JABBOUR, et al, 2018), o transplante alogênico de células-tronco apresenta desvantagens como altos índices de mortalidade e morbidade, bem como a falta de doadores compatíveis, fatores que limitam a aplicação deste tipo de tratamento (GOLDMAN, 2010).

O número de pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco para tratamento de LMC - fase crônica diminuiu significativamente desde a introdução dos ITQs. O transplante continua sendo uma opção terapêutica importante para pacientes em LMC - fase crônica, cuja doença progrediu após o uso de pelo menos 2 ITQs e àqueles que potencialmente têm a mutação T315I (DI STEFANO, et al, 2016).

Durante o tratamento é importante realizar o monitoramento regular da quantidade de BCR-ABL1 para analisar se há evidência de desenvolvimento de resistência à terapia medicamentosa e progressão da doença (ARBER, et al, 2016).

Este monitoramento molecular desempenha um papel essencial no acompanhamento clínico de pacientes com LMC. Após a introdução dos ITQs no tratamento da LMC, a PCR (reação em cadeia da polimerase) tornou-se o exame padrão ouro para a detecção de BCR-ABL1 (IZZO, et al, 2019).

A detecção do mRNA quimérico de BCR-ABL1 por qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa) atualmente é o ensaio mais sensível para monitoramento de LMC e pode detectar uma célula em aproximadamente 100.000 a 1.000.000 de células totais. O exame qRT-PCR pode ser realizado em amostras de sangue periférico. As diretrizes de consenso da European Leukemia Net (ELN) e da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomendam que o teste qRT-PCR seja utilizado para o monitoramento da doença em todos os pacientes com LMC (Yeung, et al, 2016).

A resistência a drogas é um importante desafio no tratamento com inibidores de tirosina quinase. Esta resistência ocorre devido a diversos mecanismos genéticos, sendo que um deles é alteração nos níveis de expressão de microRNAs (DI STEFANO, 2016).

Resistência a terapias pode ser classificada em primária ou adquirida. A resistência primária refere-se à falta de resposta ao tratamento e a resistência adquirida inicia-se durante o tratamento e é definida como uma progressão da doença após uma resposta inicial ao tratamento. O principal mecanismo para o desenvolvimento da resistência adquirida é a ocorrência de mutações no domínio quinase do BCR-ABL1 (LOSCOCO, et al, 2019).

O mecanismo de resistência ao imatinibe pode ser dividido em dependente ou independente de BCR-ABL. O mecanismo dependente de BCR-ABL está relacionado com a duplicação do gene da tirosina quinase BCR-ABL na sequência de DNA, levando à alta expressão da proteína. Uma mutação no domínio quinase do BCR-ABL leva à interrupção no local de ligação do imatinibe na tirosina quinase, levando à perda da resposta ao tratamento. A mutação T315I causa resistência a todos os inibidores de BCR-ABL aprovados antes do ponatinibe. O mecanismo independente de BCR-ABL ocorre devido à superexpressão da bomba de efluxo da glicoproteína P, ativação da família da quinase homóloga do oncogene do Sarcoma de Rous ou

devido a baixa expressão, atividade ou polimorfismo do transportador de cations orgânicos 1 (OCT1) (DI STEFANO, et al, 2016).

Apesar dos grandes avanços na terapia da LMC, a resistência à drogas é um importante desafio no tratamento com ITQs. A persistência do gene BCR-ABL1 em pacientes que atingiram resposta citogenética (não detecção do Cromossomo Filadélfia na medula óssea), o desenvolvimento de mutações no domínio quinase BCR-ABL1 conferindo resistência ao tratamento e o reconhecimento de que as células-tronco leucêmicas da LMC são resistentes ao tratamento com ITQ renovaram o interesse na fisiopatologia da LMC, incluindo o papel dos microRNAs (miRNAs) (WANG et al, 2007; GORDON et al., 2013; PEREZ et al, 2008).

1.3 MicroRNAs

Os miRNAs são moléculas de RNA fita simples de 19 a 25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida de RNAs mensageiros. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis proteicos de seus genes-alvo (CHENG, 2015; MONROIG, et al, 2015).

Em 1989, dois pesquisadores, Ambros e Ruvkun, trabalharam em busca de melhores conhecimentos sobre o miRNA. O primeiro direcionou seus estudos no gene lin-4 e o segundo, no gene lin-14. Ambros e colaboradores encontraram um fragmento de 700-pb que poderia conter o gene lin-4, mas não conseguiram encontrar os códons iniciais e finais. Então, eles induziram mutação no fragmento, porém a função do lin-4 permaneceu desconhecida. Desta forma, os pesquisadores concluíram que o lin-4 não poderia codificar uma proteína (LEE, et al, 1993; WIGHTMAN, et al, 1993; LEE, et al, 2004).

Ruvkun e seus colaboradores descobriram que o lin-14 comportava-se como gene *down* regulador no nível pós transcricional e que a região 3'UTR do gene lin-14 foi suficiente para a regulação temporal (WIGHTMAN, et al, 1993).

Ambros e Ruvkun chegaram a mesma conclusão: os fragmentos transcritos do lin-4 foram complementares a uma sequência repetida na região 3'UTR do gene lin-14. Em 1993, ambos descreveram, independentemente, que o pequeno fragmento não codificador de proteína lin-4

regula o lin-14 através de sua região UTR. Desta forma, um novo mecanismo regulatório celular envolvendo um fragmento transcrito não codificador de proteínas havia sido descoberto (LEE, et al, 1993; WIGHTMAN, et al, 1993; LEE, et al, 2004).

Assim, o gene lin-4 foi o primeiro miRNA a ser descoberto e foi associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans*. (BARTEL, 2004; RICARTE, 2006; ALMEIDA, 2011).

O gene de miRNA é transcrito pela RNA polimerase II. O transcrito primário (pri-miRNA) apresenta uma estrutura *hairpin*, que é processada pela enzima RNase III, Drosha, formando o miRNA precursor (pré-miRNA) de ~70 nucleotídeos. A proteína exportina 5 leva esse produto ao citoplasma para ser processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla de ~22 nucleotídeos. Uma das fitas do *duplex* de miRNA é degradada enquanto a outra permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo (RAINER, et al, 2009) (**Figura 3**).

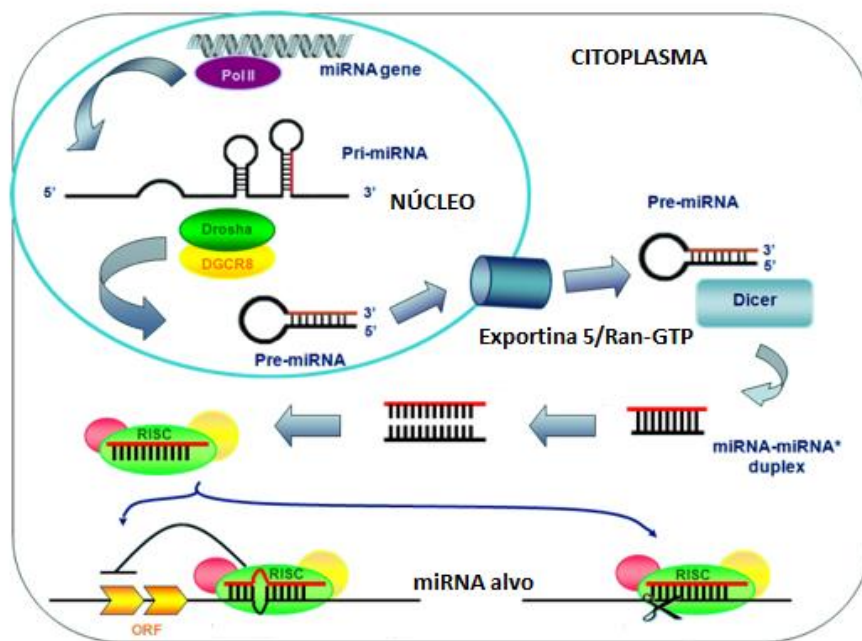


Figura 3. Biogênese dos miRNAs: síntese via enzima Drosha. O gene de miRNA é transcrito pela RNA polimerase II e o pri-miRNA é processado pela enzima RNase III (Drosha) formando o pré-miRNA, o qual é processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla. Uma das fitas do duplex de miRNA é degradada enquanto a outra permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo (Adaptado de <http://atlasgeneticsoncology.org>).

Além do mecanismo de biogênese descrito acima, existe também um outro mecanismo descrito na literatura independente do processamento pelo Drosha. O processo que leva à formação do pré-miRNA ocorre por meio de splicing celular e os miRNAs envolvidos que não sofrem ação da enzima Drosha são denominados mirtrons. (RAINER et al, 2009; Okamura et al, 2007; Ruby et al, 2007) (**Figura 4**).

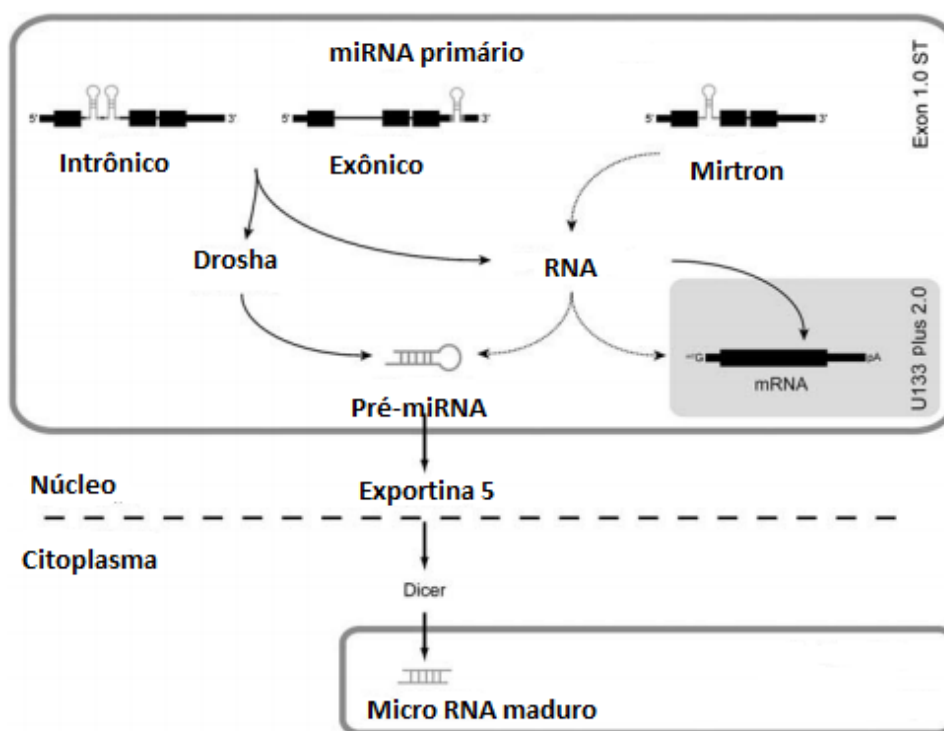


Figura 4. Biogênese dos miRNAs: diferença entre os dois diferentes processos de formação dos miRNAs: via Drosha e via mirtrons. Nesta última, os miRNAs não sofrem ação da enzima Drosha e o processo de formação do pré-miRNA ocorre por meio de splicing celular (Adaptado de Rainer, et al, 2009).

Em mamíferos, estes pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação, apoptose, diferenciação, hematopoese, entre outras funções. Estudos recentes enfatizam a importância destas moléculas ao relatar alterações na expressão dos miRNAs em diferentes patologias humanas (KIM, 2005).

Em função dos miRNAs possuírem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos RNAm-alvo, além de cooperarem no controle de um único RNAm. Alguns estudos indicam que um miRNA possa regular 200 RNAs apresentando funções totalmente diversas (NEGRINI, 2009).

Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória de sinalização celular. O crescente número de trabalhos científicos mostra o importante desempenho destes pequenos RNAs em diversos processos biológicos. Além disso, através da regulação global da expressão gênica celular e associação a diferentes funções, torna-se evidente que os miRNAs possam alterar a progressão de diversas patologias (HE, 2004).

1.4 MiRNAs e Câncer

A expressão alterada de miRNAs vem sendo relacionada a diversos tipos tumorais (SCHOTTE, 2010). Em humanos, 50% dos genes de miRNAs estão localizados em sítios genômicos associados ao câncer (ESQUELETA-KERSCHER, 2006; CHEN, 2007). Anormalidade na expressão dos miRNAs altera diversos processos, podendo resultar no desenvolvimento da doença. Dados da literatura mostram que os miRNAs podem agir como oncogenes ou genes supressores de tumor, participando, assim, no desenvolvimento e progressão do câncer (POULADI, et al, 2013).

Diversos estudos mostram a importância dos miRNAs em diferentes tipos de tumor. Um importante exemplo é o miR-21, o qual encontra-se superexpresso em câncer de mama, colorretal, pulmão, leucemia, linfoma, neuroblastoma e glioblastoma. Este miRNA tem a capacidade de alterar o mecanismo de proliferação, migração e invasão celular, além de afetar a apoptose (SELCUKLU, et al, 2009).

Outro importante grupo de miRNAs de importância no câncer é formado por: miR-17, 18a, 19a, 20a, 19b-1 e 92a-1 que compõem o *cluster* miR-17-92. Este *cluster* encontra-se significativamente superexpresso em pacientes com linfoma e câncer de pulmão e seu papel no desenvolvimento da doença é inibir genes supressores de tumor (SHUANG, et al, 2013). Esta mesma função é desenvolvida pelo miR-372 e miR-373, que promovem proliferação celular e estão presentes em câncer testicular (TAN, et al, 2018).

O perfil de expressão dos miRNAs na LMC foi primeiramente descrito por Zhu et al, ao descrever que o mecanismo regulatório dos miRNAs pode regular a expressão de diversos alvos na doença (ZHU, et al, 2014).

Estudos mostram que os miRNAs podem desempenhar função de biomarcadores para LMC, bem como ser preditivos da resposta do paciente ao tratamento com ITQ. Alguns miRNAs merecem destaque, como o miR-150 que, quando encontrado em baixa expressão, tem sido relacionado em diversos estudos a um prognóstico desfavorável. Além disso, o miR-150 pode ser utilizado como um biomarcador de resposta ao tratamento (KOTAGAMA, et al, 2015).

Outro importante miRNA de importância para a LMC é o miR-10a, o qual tem sido relacionado a marcador de resposta a drogas e marcador de diagnóstico da LMC (KOTAGAMA, et al, 2015). O cluster 17/92 tem sido relacionado a um biomarcador de progressão da LMC e também um biomarcador para diferenciação entre LMC e LMA (leucemia linfóide aguda) (XIONG, et al, 2014).

1.5 Bioinformática

A análise dos miRNAs pode ser realizada por meio da bioinformática, que permite a compreensão das vias de regulação de genes. A bioinformática do câncer é um campo emergente que integra o conhecimento do câncer e da tecnologia da informação. Esta integração é importante para avançar no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer (BANWAIT, et al, 2015). Além disso, as análises de bioinformática contribuem para a identificação dos genes alvo dos miRNAs (GAO, et al, 2019).

Uma importante ferramenta da bioinformática é o miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>), utilizada para identificar genes alvo de miRNAs diferencialmente expressos. A identificação de genes alvo é importante para a caracterização funcional de miRNAs e fornece informações sobre processos biológicos que poderiam levar a biomarcadores e preditores de resposta a medicamentos para doenças (STICHT et al, 2018).

O Gene Expression Omnibus (GEO) é um repositório público que arquiva e distribui livremente conjuntos abrangentes de microarranjos e outras formas de dados genômicos funcionais enviados pela comunidade científica. Além do armazenamento de dados, uma coleção de interfaces e aplicativos baseados na Web está disponível para ajudar os usuários a consultar e baixar os estudos e padrões de expressão gênica armazenados no GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

Os dados de microarray podem ser analisados usando o GEO2R, uma ferramenta que permite aos usuários comparar dois ou mais grupos de amostras a fim de identificar genes que são expressos diferencialmente em condições experimentais. Os resultados são apresentados como uma tabela de genes ordenados por significância (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/geo2r.html>).

Outra ferramenta de bioinformática amplamente utilizada é o Gene Ontology (GO), que fornece um conjunto de conceitos para descrever as funções dos genes e foi elaborado para a representação computacional de sistemas biológicos (DESSIMOZ et al, 2017). Esta representação computacional mostra o conhecimento científico atual sobre as funções das proteínas e moléculas de RNA não codificadoras produzidas pelos genes de diversos organismos. As diferentes funções dos genes são chamadas de termos (<http://geneontology.org/>).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil de miRNAs expressos em amostras de sangue periférico de pacientes com LMC tratados com TCPH-alo e mesilato de imatinibe e, por meio de ferramentas de bioinformática, prever possíveis genes e vias alvos de miRNAs.

2.2 Objetivos Específicos

Encontrar um perfil de miRNAs e seus genes e vias alvos, por meio de ferramentas de bioinformática, comparando-se os grupos: (1) pacientes com LMC recém diagnosticados que não iniciaram tratamento *versus* pacientes com LMC tratados com transplante de medula óssea e (2) pacientes com LMC tratados com transplante de medula óssea *versus* pacientes com LMC tratados com mesilato de imatinibe.

3. REFERÊNCIAS

ALADAĞ E, HAZNEDAROĞLU İC. Current perspectives for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Turk J Med Sci*, 49, 1-10. 2019.

ALMEIDA, M.I.; REIS, R.M.; CALIN, G.A. Micro-RNA history: Discovery, recent applications and next frontiers. *Mutation Research*, v. 717, p. 1-8, 2007.

ARBER DA, ORAZI A, HASSERJIAN R, THIELE J, BOROWITZS MJ, LE BEAU MM. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *BLOOD* 127(20): 2391-2405, 2016.

AZEVEDO LD, BASTOS MM, OLIVEIRA AP, BOECHAT N. Sínteses e propriedades de fármacos inibidores da tirosina quinase BCR-ABL utilizados no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Quim Nova* 40 (7):791-809, 2017.

BACCARANI M, CASTAGNETTI F, GUGLIOTTA G, et al. The proportion of different BCR/ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview. *Leukemia* 33, 1173-1183, 2019.

BARTEL, D.P. Micro-RNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*, v.116(2), p. 281-297, 2006.

BAVARO L, MARTELLI M, CAVO M, SOVERINI S. Mechanisms of Disease Progression and Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukemia: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6141, 1-23, 2019.

BENNOUR, A.; SAAD, A.; SENNANA, H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 97, p. 263-174, 2016.

BRAICU, et al. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death and Differentiation*, v. 22, p. 34-45, 2015.

BU, N. Immune protection effect of exosomes against attack of L1210 tumor cells. *Leuk Lymphoma*, v.47, p. 913–918, 2006.

BUSCHOW, S.I. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*, v.10, p. 1528–1542, 2009.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Leucemia Mieloide Crônica. In: FIGUEIREDO, M.S.; KERBAUY, J.; LOURENÇO, D.M. Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da UNIFESP-EPM – HEMATOLOGIA. São Paulo: Ed. Manole, p. 481-488, 2011.

CHEN, K.; RAJEWSKY, N. The evolution of gene regulation by transcription factors and micro-RNAs. *Nature*, v. 8, p. 93-103, 2007.

CHENG, G. Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 81, p. 75-93, 2015.

CLAYTON, A.; MASON, M.D. Exosomes in tumour immunity. *Curr Oncol*, v.16, p. 46–49, 2009.

CHASSERIAU, J, RIVET J, BILAN F, CHOMEL JC, GUILHOT F, BOURMEYSTER N. Characterization of the Different BCR-ABL Transcripts with a Single Multiplex RT-PCR. *Journal of Molecular Diagnostics*. 6 (4) 343-347, 2004

CHO, J.A. et al. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol*, v. 40, p. 130-138, 2012.

COMERT, M.; BARAN, Y.; SAYDAM, G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. *Am J Blood Res*, v. 3, p.191-200, 2013.

DENZER, K, et al. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*, v. 165, p.1259–1265, 2000.

DESSIMOZ C, SKUNCA N. The Gene Ontology Handbook In: The Gene Ontology and the Meaning of Biological Function (THOMAZ, PD). Springer Open. New York, 2017.

DI STEFANO, C, MIRONE, G, PERNA S, MARFE G. The roles of microRNAs in the pathogenesis and drug resistance of chronic myelogenous leukemia (Review). *Oncology Reports* 35: 614-624, 2016.

DRUKER, B.J. Translation of the Philadelphia chromosome into the therapy for CML. *Blood*, v. 112. p. 4808-4817, 2008.

ESQUELA-KERSCHER, A; Slack, F.J. Oncomirs - micro-RNAs with a role in cancer. *Nature*, v. 6, p.259-269, 2006.

FERDINAND, R. et al. Treatments for chronic myeloid leukemia: a qualitative systematic review. *Journal of Blood Medicine*, p. 51-76, 2012.

GOLDMAN JM. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin Hematology* 47:302-311, 2010.

GORDON, J. E. A.; WONG, J, J.-L.; RASKO, J. E. J. 2013. MicroRNAs in myeloid malignancies. *British Journal of Haematology*, v. 162, p. 162-176, 2013.

HE, L.; HANNON, G. J. Micro-RNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature*, v.5, p. 522- 531, 2004.

HORNICK, N.I., et al. Serum Exosome MicroRNA as a Minimally-Invasive Early Biomarker of AML. *Sci. Rep.* 5, 11295, 2015.

HUGHES, T. et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Journal of Clinical Oncology*, v. 27, n. 25, p. 4202-4210, 2009.

IZZO B, GOTTARDI EM, ERRICHIELLO S , DARAIO F, BARATÈ C, GALIMBERTI S. Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches. Vol 9, 2019.

JABBOUR, E. et al. Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood*, v. 114, n. 10, p. 2037-2043, 2009.

JABBOUR E, KANTARJIAN H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol* 93:442-459, 2018.

KANTARJIAN, H. M. et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*, v. 119, n. 5, p. 1123-1129, 2012.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature*, v.6, p. 376 – 385, 2005.

KOTAGAMA K, CHANG Y, MANGONE M. miRNAs as biomarkers in chronic myelogenous leukemia. *Drug Dev Res* 76(6) 278-285, 2015.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v. 75 (5), p. 843–854, 1993.

LEE, R.; FEINBAUM, R.; AMBROS, V. A short history of a short RNA. *Cell*, v. 116 (Suppl. 2), p. 89–S92, 2004.

LIU, C. et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol*, v.176, p. 1375–1385, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, v.25, n.4, p. 402-408, 2001.

LOSCOCO, F, VISANI G, GALIMBERTI S, et al. BCR-ABL independent mechanisms of resistance in chronic myeloid leukemia. *Front Oncol* 9:939 1-11, 2019.

MONROIG, P.D.C. et al. Small molecule compounds targeting miRNAs for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 81, p. 104-116, 2015.

NEGRINI, M; NICOLOSO, M.S; CALIN, G. A. Micro-RNAs and câncer-new paradigms in molecular oncology. *Current Opinion in Biology*, v. 21, p.470-479, 2009.

OKAMURA, K. The mirtron pathway generates microRNAs-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, v. 130, p. 89-100, 2007.

OKOYE, I.S., et al. MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity*, v.41, p. 89–103, 2014.

PANT, S.; HILTON, H.; BURCZYNSKI, M.E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol*, v. 83, p. 1484–1494, 2012.

PEREZ, D. S. et al. Long, abundantly expressed non-coding transcripts are altered in cancer. *Hum Mol Genet*, v.17, p. 642-655, 2008.

PFEFFER, S.R. Two Rabs for exosome release. *Nat Cell Biol*, v.12, p. 3-4, 2010.

POULADI, N, et al. Overlapping region of p53/WRAP53 transcripts: mutational analysis and sequence similarity with microRNA-4732-5p. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 14(6), p. 3503–3507, 2013.

RAINER, et al. Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, v. 23, p. 746-752, 2009.

RICARTE FILHO, J.C.M; KIMURA, E.T. MicroRNAs: Nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v.50, p. 1102 – 1107, 2006.

RUBY, J.G. et al. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res*, v.17, p. 1850–1864, 2007.

SCHOTTE, D. et al. Micro-RNAs characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, v. 96(5), p. 703-711, 2011.

SELCUKLU, SD, DONOGHUE MT, SPILLANE C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans* 37: 918-925, 2009.

SKOG, J et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, v. 10, p. 1470–1476, 2008.

SHUANG T, SHI C, CHANG S, et al. Downregulation of miR-17~92 expression increase paclitaxel sensitivity in human ovarian carcinoma SKOV3-TR30 cells via BIM instead of PTEN. *Int J Mol Sci* 14: 3802-3816, 2013.

SOVERINI S, BASSAN R, LION T. Treatment and monitoring of Philadelphia chromosome-positive leukemia patients: recent advances and remaining challenges. *Journal of Hematology & Oncology* 12:39, p. 1-14, 2019

SOVERINI S, MANCINI M, BAVARO L, CAVO M, MARTINELLI G. Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Molecular Cancer* 17:49, 1-15, 2018.

STICHT C, DE LA TORRE C, PARVEEN A, GRETZ N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One*. Oct 18;13(10):1-6, 2018.

TAN W, LIU B, QU S. MicroRNAs and cancer: key paradigms in molecular therapy (Review). *Oncology Letters* 15: 2735-2742, 2018.

TAYLOR, D.D.; GERCEL-TAYLOR C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol*, v. 33, p. 441-454, 2011.

XIONG Q, YANG Y, WANG H, et al. Characterization of miRNomes in acute and chronic myeloid leukemia cell lines. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 12:79–91, 2014.

YEUNG CCS, EGAN D, RADICH JP. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: present and future. *Expert Rev Mol Diagn*. 16(10): 1083–1091, 2016.

ZHANG, X., et al. Exosomes in cancer: small particle, big player. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 8:83, p. 1-13, 2015.

ZHU, et al. Studies on microRNAs that are correlated with the cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. *Mol Cell Biochem*, v. 390, p. 75-84, 2014.

WANG, X. D. et al. Identification of candidate predictive and surrogate molecular markers for dasatinib in prostate cancer: rationale for patient selection and efficacy monitoring. *Genome Biol*, v. 8, n. R255, 2007.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, v.75 (5), p. 855–862, 1993.



Comparison of microRNA Expression Profile in Chronic Myeloid Leukemia Patients Newly Diagnosed and Treated by Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Juliana Ravelli Baldassarre Martins ¹, Leonardo Nazario de Moraes ², Sarah Santiloni Cury ³, Juliane Dadalto ¹, Juliana Capannacci ¹, Robson Francisco Carvalho ³, Célia Regina Nogueira ¹, Newton Key Hokama ¹ and Paula de Oliveira Montandon Hokama ^{1*}

¹ Department of Internal Medicine, São Paulo State University (UNESP-FMB), Botucatu, Brazil, ² Department of Bioprocesses and Biotechnology, São Paulo State University (UNESP-FCA), Botucatu, Brazil, ³ Department of Structural and Functional Biology, São Paulo State University (UNESP-IBB), Botucatu, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Deilson Elgui De Oliveira,
São Paulo State University, Brazil

Reviewed by:

Mohammad Sarwar Jamal,
King Abdulaziz University, Saudi Arabia
Clement M. Lee,
Icahn School of Medicine at Mount
Sinai, United States

*Correspondence:

Paula de Oliveira Montandon Hokama
paula.hokama@unesp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology, a
section of the journal Frontiers in
Oncology

Received: 13 July 2019

Accepted: 20 July 2020

Published: 04 September 2020

Citation:

Martins JRB, Moraes LN, Cury SS,
Dadalto J, Capannacci J, Carvalho RF,
Nogueira CR, Hokama NK and
Hokama POM (2020) Comparison of
microRNA Expression Profile in
Chronic Myeloid Leukemia Patients
Newly Diagnosed and Treated by
Allogeneic Hematopoietic Stem Cell
Transplantation.
Front. Oncol. 10:1544.
doi: 10.3389/fonc.2020.01544

Chronic myeloid leukemia (CML) results from a translocation between chromosomes 9 and 22, which generates the Philadelphia chromosome. This forms BCR/ABL1, an active tyrosine kinase protein that promotes cell growth and replication. Despite great progress in CML treatment in the form of tyrosine kinase inhibitors, allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is currently used as an important treatment alternative for patients resistant to these inhibitors. Studies have shown that unregulated expression of microRNAs, which act as oncogenes or tumor suppressors, is associated with human cancers. This contributes to tumor formation and development by stimulating proliferation, angiogenesis, and invasion. Research has demonstrated the potential of microRNAs as biomarkers for cancer diagnosis, prognosis, and therapeutic targets. In the present study, we compared the circulating microRNA expression profiles of 14 newly diagnosed patients with chronic phase-CML and 14 Philadelphia chromosome-negative patients after allo-HSCT. For each patient, we tested 758 microRNAs by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis. The global expression profile of microRNAs revealed 16 upregulated and 30 downregulated microRNAs. Target genes were analyzed, and key pathways were extracted and compared. Bioinformatics tools were used to analyze data. Among the downregulated miRNA target genes, some genes related to cell proliferation pathways were identified. These results reveal the comprehensive microRNA profile of CML patients and the main pathways related to the target genes of these miRNAs in cytogenetic remission after allo-HSCT. These results provide new resources for exploring stem cell transplantation-based CML treatment strategies.

Keywords: miRNAs, chronic myeloid leukemia, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, biomarkers, Philadelphia chromosome

INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease accounting for ~20% of diagnosed adult cases (1, 2). CML was the first human malignant disease to be linked to a chromosomal abnormality. A translocation between chromosomes 9q34 and 22q11 generates the Philadelphia chromosome. This encodes the BCR/ABL1 oncoprotein, an active tyrosine kinase protein that is the main driver of CML pathogenesis (2, 3). There have been great developments and improvements in anticancer targeted therapy associated with CML (4). Imatinib was the first member of a class of small molecules that prevent tyrosine kinase activity to be developed, and acts by binding to the BCR-ABL1 protein. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) act upon the interaction between the BCR-ABL1 oncoprotein and ATP, blocking cellular proliferation of the malignant clone. However, ~2% of patients become resistant to TKIs. Allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the only curative treatment for CML and provides an important alternative for TKI-resistant or advanced phase CML patients (2). However, the mortality and morbidity of this method, as well as a lack of suitable donors, limits the application of allo-HSCT (5).

The natural course of CML begins in the chronic phase and progresses to the blast phase, passing through the accelerated phase. The transformation mechanisms involved with this process are varied and not yet fully understood. The interruption of differentiation, genomic instability, shortening of telomeres, and loss of tumor suppressor functions are among the steps of this transformation that have already been described (6, 7).

Recent advancements in gene expression profiling technology have demonstrated that microRNAs (miRNAs) are promising prognostic predictors of different types of cancers. miRNAs, which modulate post-transcriptional gene expression, are 18–25-nucleotide non-coding RNAs (8–10). They regulate gene expression and modify cancer processes such as differentiation, proliferation, and apoptosis. Previous studies have suggested that miRNAs play important roles in regulating angiogenesis and metastasis (11, 12). Additionally, miRNAs are very stable molecules in the blood, suggesting that they can be applied as molecular markers (13).

Bioinformatics is an important research approach that can be applied for understanding gene regulation pathways. Cancer bioinformatics is an emerging field that integrates knowledge from cancer and information technology. Integrating cancer research and bioinformatics is important for advancing the diagnosis, prognosis, and treatment of cancer (14). Additionally, bioinformatics analyses have contributed to the identification of candidate genes and miRNA-mRNA target pairs (15).

This study was conducted to determine the profiles of miRNAs and their target genes in CML patients treated with allo-HSCT. These profiles were then compared to those of a newly diagnosed and untreated patient group.

PATIENTS AND METHODS

The study was previously approved by the Research Ethics Committee of the Dr. Amaral Carvalho Hospital, Jahu, SP, Brazil

(CEPHAC--2.917.389). The patients provided informed consent to participate in the study, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Patients and Samples

A total of 28 patients diagnosed with chronic phase-CML and treated at the Dr. Amaral Carvalho Hospital were included in the study. The patients were separated into two groups: (1) 14 patients newly diagnosed with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) CML who had not been treated with TKIs; and (2) 14 patients who achieved complete cytogenetic remission (Philadelphia chromosome-negative) post-allo-HSCT. Patient characteristics are described in **Table 1**. The present study used a leukocyte pool of 14 healthy blood donors as a control group. To determine the miRNA profiles of each patient group, the control group was compared to the patient groups to determine which miRNAs were upregulated or downregulated. All transplanted patients received BuCy-2 as a conditioning regimen and cyclosporine and methotrexate as graft-vs.-host disease prophylaxis (16, 17).

Total RNA Isolation and RT-qPCR

Total RNA isolation was performed using a QIAamp R RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) with 5 mL peripheral blood. RNA integrity and quantity were evaluated by NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and RNA 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

The total RNA was reverse-transcribed using a Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit, and a TaqMan™ MGB probe was used for real-time qPCR according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR and TaqMan R Low Density Array Human MicroRNA Arrays A v2.0 and B v3.0 (ABIV^R, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were performed on a ViiA7 platform (ABIV^R) following the manufacturer's instructions. miRNAs were quantified using the comparative Ct-method (18). Each Human Pool Set contains 377 unique human miRNAs, three internal controls, and one negative control. A total of 758 miRNAs were analyzed.

Bioinformatic Analysis

The study followed the experimental procedure detailed in **Figure 1**. Expression Suite Software Version 1.1 Program was used to identify differentially expressed miRNAs. To identify possible differentially expressed miRNA targets, we conducted RT-qPCR using miRWalk 2.0, which includes target prediction data generated by different algorithms (including own algorithm) (19). The following algorithms were selected: miRWalk, miRDB, Micro T4, miRanda, RNAhybrid, and Targetscan. Only targets predicted by at least three of the selected algorithms were accepted. We then verified whether the predicted targets have been identified as being differentially expressed in CML using microarray data available from Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), accession number GSE43225. Microarray data were analyzed using the GEO2R script (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>).

TABLE 1 | Patient clinical data.

Patient	Gender	Age	BCR-ABL (%)		Breakpoint
Untreated group					
1	M	61	92		b2a2
2	M	52	100		b2a2
3	M	35	100		b2a2
4	F	54	100		b2a2
5	M	46	73		b3a2
6	M	72	100		b2a2
7	F	80	100		b3a2
8	M	67	100		b3a2
9	M	59	40		b2a2
10	M	60	82		b2+b3
11	F	52	100		b3a2
12	M	37	100		b3a2
13	F	53	100		b3a2
14	M	72	100		b3a2

Patients	Gender	Age	HSCT indication	Source	DAT	BCR-ABL (%)	Breakpoint	Mutation	Follow up
Hematopoietic stem cell transplantation group									
1	M	37	Disease progression	BM	224	1.60	b2a2	Absence	Relapsed
2	F	44	Failed therapy	BM	231	1,20	b3a2	Absence	Relapsed
3	F	03	Disease progression	BM	208	0.20	b3a2	—	Relapsed
4	F	63	Chronic Phase	BM	1569	0.20	b3a2	Absence	Relapsed
5	M	37	Failed therapy	BM	110	0.50	b2a2	—	Relapsed
6	M	43	Chronic Phase	BM	2450	0.30	b3a2	—	MMR
7	M	48	Disease progression	PBSC	80	0.75	b3a2	Absence	MMR
8	M	35	Failed therapy	BM	2352	0.03	b3a2	Absence	Relapsed
9	M	42	Failed therapy	PBSC	3561	0.01	b2a2	—	Relapsed
10	F	42	Disease progression	PBSC	3708	0.01	b3a2	—	MMR
11	F	56	Chronic Phase	BM	3932	0.03	b2a2	Absence	MMR
12	M	32	Chronic Phase	PBSC	3242	0.08	b2a2	—	Relapsed
13	M	21	Chronic Phase	BM	1949	0.30	b3a2	Absence	Relapsed
14	M	58	Disease progression	BM	41	0.02	b2a2	—	MMR

DAT, days after transplantation; BM, bone marrow; PBSC, peripheral blood stem cell; (–), BCR-ABL mutation test was not performed; MMR, Major molecular response (BCR-ABL1 transcript level $\leq 0.1\%$).

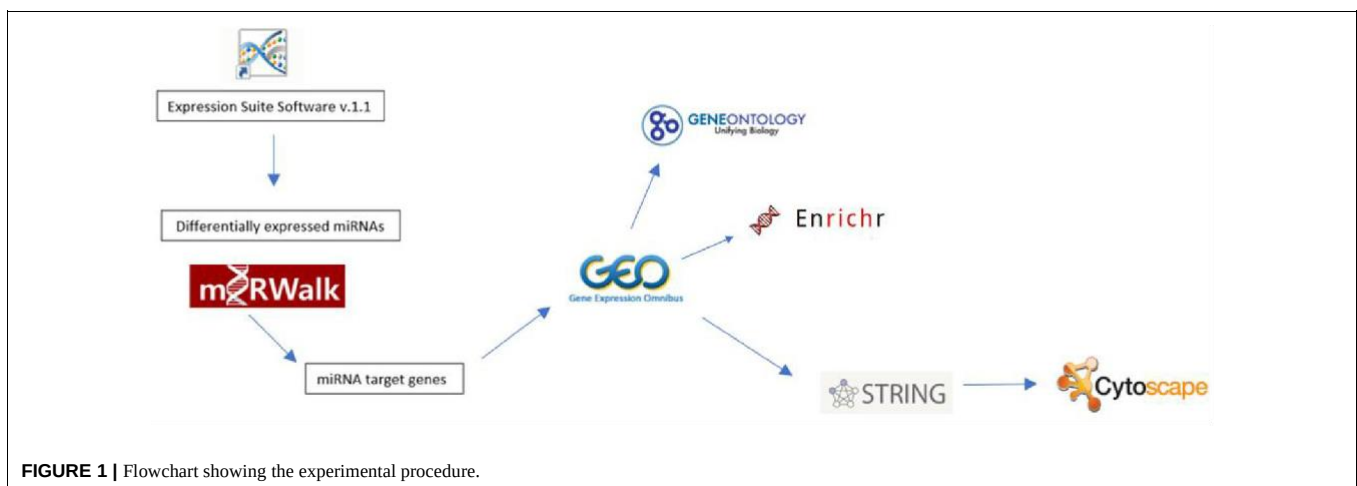


TABLE 2 | Dysregulated miRNAs in chronic myeloid leukemia.

miR	miRBase ID	FC	P-value
hsa-miR-1260a	MIMAT0005911	0.013	0.000
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	0.082	0.000
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	0.083	0.000
mmu-miR-374b-5p	MIMAT0003727	0.105	0.000
hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	0.150	0.000
hsa-miR-181c-5p	MIMAT0000258	0.159	0.000
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	0.160	0.000
hsa-miR-212-3p	MIMAT0000269	0.164	0.000
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	0.172	0.000
hsa-miR-26a-1-3p	MIMAT0004499	0.180	0.000
hsa-miR-181a-5p	MIMAT0000256	0.189	0.000
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	0.224	0.008
hsa-miR-363-3p	MIMAT0000707	0.243	0.001
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	0.252	0.000
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	0.259	0.014
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	0.291	0.000
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	0.291	0.002
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	0.292	0.029
hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	0.310	0.000
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	0.318	0.000
hsa-miR-18a-3p	MIMAT0002891	0.329	0.000
hsa-miR-27b-3p	MIMAT0000419	0.331	0.003
hsa-miR-374a-5p	MIMAT0000727	0.343	0.009
hsa-miR-362-5p	MIMAT0000705	0.350	0.000
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	0.402	0.000
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	0.417	0.000
hsa-miR-550a-5p	MIMAT0004800	0.417	0.003
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	0.444	0.046
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	0.477	0.001
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	0.496	0.000
hsa-miR-15b-3p	MIMAT0004586	2.005	0.039
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	2.179	0.013
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	2.233	0.000
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	2.338	0.039
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	2.492	0.002
hsa-miR-628-3p	MIMAT0003297	2.589	0.010
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	2.748	0.034
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	2.764	0.001
hsa-miR-484	MIMAT0002174	2.820	0.000
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	3.969	0.007
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	3.973	0.000
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	4.513	0.000
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	5.070	0.000
hsa-miR-7-1-3p	MIMAT0004553	5.650	0.000
mmu-miR-134-5p	MIMAT0000146	6.473	0.002
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	10.905	0.004

FC, fold-change; miR, microRNA.

We considered genes to be differentially expressed when they showed a fold-change of at least 1.5. Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>) was used to search for enriched terms among differentially expressed genes, accepting only terms with $P \leq 0.05$ and using Bonferroni's correction. Differentially expressed genes related to upregulated and downregulated

miRNAs were analyzed according to EnrichR (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) for enrichment analysis. Reactome was used for analysis. To assess the protein-protein interaction (PPI) network based on a list of genes, the online tool STRING Version 11.0 (<https://string-db.org/>) was utilized. Experiments, databases, co-expression data, neighborhood, and co-occurrence were considered active interaction sources. The minimum required interaction score was 0.700. Finally, we used Cytoscape Version 3.8.0 (<http://www.cytoscape.org>) software to visualize the enrichment results. Network nodes represent genes, while edges represent protein-protein associations.

Statistical Analysis

Comparative C_T analysis was used to quantify miRNA gene expression. The differences were estimated by Student's *t*-test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Differentially Expressed miRNAs

The miRNA expression data set is available in the NCBI GEO database (accession number GSE 148567). A total of 758 miRNAs were analyzed by RT-qPCR in peripheral blood samples from 14 newly diagnosed patients and untreated chronic phase CML patients, and 14 patients in cytogenetic remission after allo-HSCT. According to the cut-off criteria (fold-change ≤ 0.5 and fold-change ≥ 2.0), 46 differentially expressed miRNAs were identified. Sixteen (34.8%) miRNAs were upregulated, and thirty (65.2%) were downregulated (Table 2). Among them, miR-1260a was the most downregulated miRNA, whereas miR-409-3p was the most upregulated miRNA. The main functions of all differentially expressed miRNAs are listed in Table 3.

MiRNA Target Genes

Upregulated and downregulated miRNAs were analyzed in miRWalk to identify the miRNA target genes. Using microarray analysis, 1,069 genes were identified.

Gene Expression

We evaluated whether the identified target genes were previously differentially expressed in CML using available microarray data in the Gene Expression Omnibus. The microarray data were analyzed using GEO2R script. The identified genes were compared to our results. Of the 822 genes related to downregulated miRNA, 789 (96%) were also identified among the Gene Expression Omnibus microarray data genes. Among the genes associated with upregulated miRNAs, 247 genes were found in the patients included in the experiment, and 234 (95%) were found in the data searched.

Pathway Enrichment Analysis and PPI Network Construction

GO analysis (including Molecular Function, Biological Process and Cellular Component) was performed on 1,069 target genes. A total of 461 results were obtained from GO analysis. The top 30 terms are shown in Figure 2.

TABLE 3 | Functions of dysregulated miRNAs in chronic myeloid leukemia.

miR Name	Dysregulation in cancer	References
hsa-miR-1260a	Down-regulated in follicular B-cell lymphoma	(20)
hsa-miR-27a-3p	Involved in tumor growth: cell proliferation and cell invasion	(21)
hsa-miR-140-3p	Chemoresistance in osteosarcoma and colon cancer	(22)
mmu-miR-374b-5p	Inhibits cell migration, proliferation and invasion in cervical cancer	(23)
hsa-miR-143-3p	Low expression level contributes to tumor development, differentiation, proliferation, invasion and metastasis	(24)
hsa-miR-181c-5p	Inhibits chemoresistance in chronic myelocytic leukemia	(25)
hsa-miR-26b-5p	Down-regulated in breast cancer	(26)
hsa-miR-212-3p	Inhibits cell proliferation and promotes apoptosis	(27)
hsa-miR-29c-3p	Deregulated in hematological malignances	(28)
hsa-miR-26a-1-3p	Tumor suppressor	(29)
hsa-miR-181a-5p	Downregulation in resistance to imatinib	(30, 31)
hsa-miR-19a-3p	Potential biomarker for CML	(32)
hsa-miR-363-3p	Tumor suppressor in gastric cancer	(33)
hsa-miR-30d-5p	Downregulation in resistance to imatinib	(30, 31)
hsa-miR-10a-5p	Biomarker of drug response in CML	(34)
hsa-miR-29a-3p	Deregulated in hematological malignances	(28)
hsa-miR-16-5p	Regulation of cell cycle and apoptosis in myeloid leukemogenesis	(35)
hsa-miR-486-5p	Expression increased in erythroid differentiation in CML	(36)
hsa-miR-345-5p	Tumor suppressor in pancreatic cancer	(37)
hsa-miR-26a-5p	Tumor suppressor	(29)
hsa-miR-18a-3p	Potential biomarker for CML	(32)
hsa-miR-27b-3p	Oncogene; expression increased in lymphoma	(38)
hsa-miR-374a-5p	Promotes proliferation and migration of transformed mesenchymal stem cells	(39)
hsa-miR-362-5p	Induces apoptosis resistance and cell proliferation in gastric cancer	(40)
hsa-let-7g-5p	Downregulated in Burkitt's lymphoma	(41)
hsa-miR-324-3p	Overexpression promotes cell growth and decreases apoptosis	(42)
hsa-miR-550a-5p	Tumor suppressor	(43)
hsa-miR-125a-3p	Induces apoptosis in pancreatic cancer	(44)
hsa-miR-106b-5p	Inhibits metastasis and invasion colorectal cancer cells	(45)
hsa-miR-191-5p	Disregulated in human glioblastoma tissues	(46)
hsa-miR-15b-3p	High expression in poor prognosis for hepatocellular carcinoma	(47)
hsa-miR-328-3p	CML progression	(48)
hsa-miR-222-3p	Cancer development as oncomiR or as oncosuppressor	(49)
hsa-miR-139-5p	Antimetastatic and anti-oncogenic activity	(50)
hsa-miR-92a-3p	Higher levels in acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia	(51)
hsa-miR-628-3p	Inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells	(52, 53)

(Continued)

TABLE 3 | Continued

miR Name	Dysregulation in cancer	References
hsa-miR-150-5p	CML progression; CML biomarker	(54)
hsa-miR-574-3p	Tumor suppressor in ovarian cancer	(55)
hsa-miR-484	Highly expressed in breast cancer patients	(56)
hsa-miR-127-3p	Tumor suppressors in gastric cancer	(57)
hsa-miR-146a-5p	Development and maintenance of neoplastic processes	(58)
hsa-miR-193a-5p	Low expression in lung cancer	(59)
hsa-miR-342-3p	Suppresses acute myeloid leukemia cell proliferation	(60)
hsa-miR-7-1-3p	Up-regulated in metastatic prostate cancer	(61)
mmu-miR-134-5p	Cancer cell proliferation	(62)
hsa-miR-409-3p	Tumor suppressor in endometrial carcinoma cells	(63)

Fc, fold change; miR, microRNA.

EnrichR is a free web-based gene signature search tool. It was used to evaluate the 247 target genes of upregulated miRNAs, among which 573 terms were identified. Among the 822 target genes of downregulated miRNAs, 1,017 terms were found. EnrichR provides a visualization summary of the pathways based on a collective gene function list. The free pathway database tool Reactome is available for online use, and provides biological interpretation and visualization models for network analysis. STRING analysis was performed on the target genes of upregulated miRNAs (**Figure 3**) and downregulated miRNAs (**Figure 4**). The results were visualized using Cytoscape.

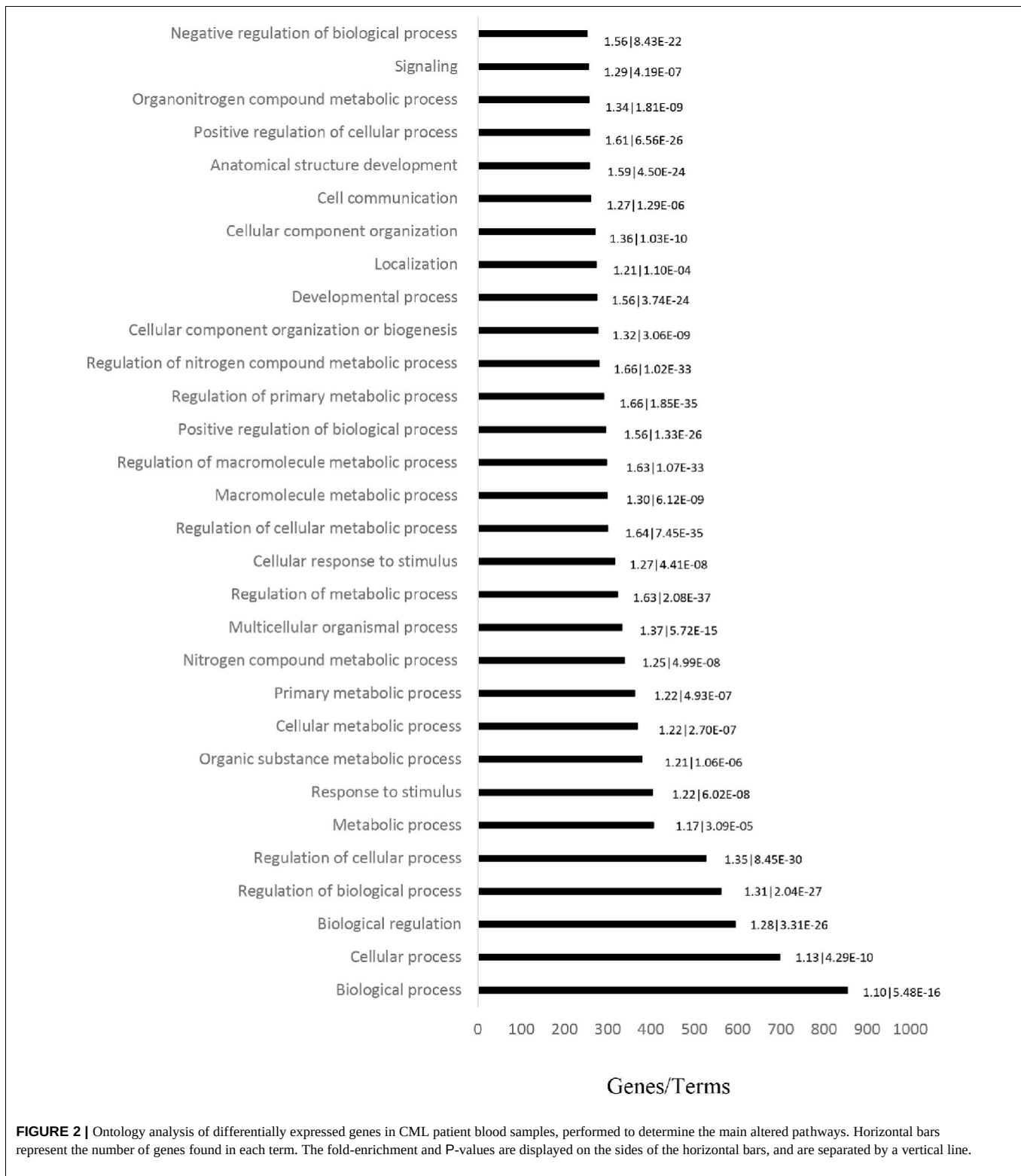
DISCUSSION

Differentially Expressed miRNAs

MiRNAs can act as oncogenes or tumor suppressor genes in CML, contributing to the pathogenesis, disease progression, and therapeutic responses (1, 52). Following the advent of TKIs as specific target drugs, hematopoietic stem cell transplantation began to play an important role in treating CML patients that are in the disease phase or are resistant to TKIs. This study investigated the miRNA profile of a group of 14 CML patients treated with allo-HSCT, who were in complete cytogenetic remission at the time of sample collection. Among the evaluated group, five patients underwent transplantation due to disease progression (patients 1, 3, 7, 10, and 14) and four others underwent transplantation due to a failed therapeutic response (patients 2, 5, 8, and 9). These comprised a total of 64.3% of the evaluated patients.

miR-10a

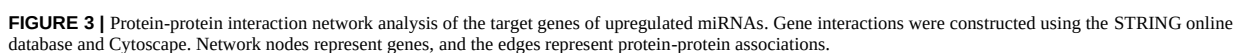
MiR-10a has been extensively studied due to its potential as a CML marker. Flamant et al. suggested the relevance of miR-10a as a drug response biomarker. By means of microarray analysis, a significant increase in miR-10a was observed in patient samples 2 weeks



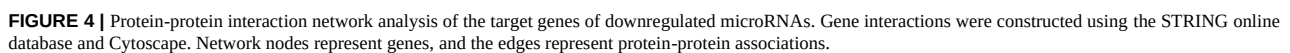
post-imatinib treatment (34). miR-10a downregulation was also detected in the transplanted patient group in the present study.

miR-17/92 Cluster

The miR-17/92 cluster is another potential biomarker for CML progression, and may be detected from the chronic phase to



miR-328 and miR-150 are also related to disease progression (32, 48, 54, 64). Eiring et al. (48) have previously demonstrated the loss of miR-328 in blastic crisis CD34⁺ cells, which did



previous findings by Agirre et al. (64) and Fallah et al. (54) suggested that the downregulation of miR-150 is a potential diagnostic marker of CML. RT-PCR was performed for 50

samples from patients newly diagnosed with CML, revealing a downregulation in miR-150. In our study, both miRNAs were found to be upregulated, suggesting that miR-328 and miR-150 are useful as molecular biomarkers of the treatment response.

miR-486

The results of previous studies have also suggested miR-486 as an effective treatment response marker. Wang et al. compared miRNA expression in normal human CD34⁺ cells with that in CML CD34⁺ cells, using human leukemia cell lines and CD34⁺ cells isolated from chronic phase CML patients who had not been treated with imatinib. The results showed that miR-486 was overexpressed in CML cells, especially in megakaryocytes and erythroid progenitor cells (36). In our study, miR-486 was downregulated, further suggesting the potential of this miRNA to act as a biomarker of the treatment response.

miR-181c and miR-30

According to studies carried out in the K562 cell line, miR-181c, and miR-30 downregulation is related to imatinib resistance (30, 31). Yu et al. demonstrated that the downregulation of miR-30 in this CML cell line was related to the autophagy process and imatinib resistance mechanisms (30, 31). These results were reflected in the current study, with our findings demonstrating that miR-181c and miR-30 were downregulated.

Let-7g and miR-16

Let-7a and miR-16 also have important functions in myeloid leukemogenesis, such as regulating the cell cycle and apoptosis. Let-7a regulates oncogenes such as RAS and HMGA, while Mir-16 targets MCL1, BCL2, WNT3A, and CCND1 (35). Let-7a is also a member of the let-7 family, and it has been found that it may suppress CML via *CRKL* (20). Zuo et al. (35) examined the plasma levels of miR-16 and let-7a in a group of 50 patients with myelodysplastic syndrome (MDS). After comparing these results with those from a group of 76 healthy donors, it was found that both miRNAs were significantly lower in MDS patients than in healthy controls. In the present study, we found that let-7g and miR-16 were downregulated.

Pathway Enrichment Analysis and PPI Network Construction

In the analysis conducted using STRING and EnrichR, it was possible to determine which pathways were enriched by observing the target genes of unregulated miRNAs. Through our analysis, we found that MAPK, NRAS, KRAS, and ROCK had important functions related to CML regulation pathways.

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is an important signaling cascade in several types of cancer, including CML (65). This pathway controls fundamental cellular processes such as cell proliferation, migration, growth, differentiation, and death (66). The MAPK pathway therefore plays a fundamental

role in cell growth and survival, and irregularities in this pathway can lead to cells developing cancerous properties. This may include exacerbated cell proliferation, metastasis, and evasion of apoptosis (67).

RAS proteins are involved in signal transduction, and are mutated in different types of human cancer. The RAS family comprises three genes associated with carcinogenesis: HRAS, KRAS, and NRAS (68). These three genes encode a protein located on the inner cell membrane, which has GTPase activity. This protein participates in extracellular signal transduction into the cell, and the signal is transmitted by a cascade of kinases. As a result, MAPK is activated, which then activates transcription factors. Mutations in the RAS genes in human cancer inhibit GTP hydrolysis, and mutated RAS proteins remain in their GTP-linked active form. This, leads to disordered cell proliferation (69). KRAS and NRAS mutations are frequently found in myeloid disorders, including CML (70).

ROCK proteins perform different functions in cells. They are involved in organization of the actin cytoskeleton, human tumor pathogenesis, and in the signaling pathways that lead to cell proliferation. The RAS and ROCK pathways are interconnected, with RAS activating PI3K, which then activates the ROCK pathway. This interaction network can lead to continuous cell proliferation and survival (68).

The MAPK, RAS, and ROCK genes had increased expression in the patient group of our study. As these genes are involved in cell proliferation during leukemogenesis, it can be concluded that these genes play an important role in post-transplant evolution. Nine of the 14 patients (64.3%) had leukemia relapse, and the other five (35.7%) did not achieve a deep molecular response (BCR-ABL transcript level $\leq 0.01\%$).

This study explored miRNAs in CML patients and their target genes, and analyzed the pathways involved. Our study was based on original and clinical samples. However, as there were scarce samples available and these were insufficient to validate the 46 altered miRNAs, the study was limited by this factor. The bioinformatics analyses predicted interactions that require further biological validation before their therapeutic application.

Despite the small sample size, these findings showed that aggressive therapy such as transplantation did not alter the disease course in these group of CML patients. Furthermore, the demonstrated pattern of gene expression is suggestive of disease progression.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

ETHICS STATEMENT

This study was reviewed and approved by Research Ethics Committee of Dr. Amaral Carvalho Hospital—Jahu-SP- Brazil.

(CEPHAC—2.917.389). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PH, NH, and CN designed and coordinated the study and prepared the manuscript. JM, LM, and SC performed bioinformatics analysis and prepared the manuscript. JD and JC collected and analyzed the data. RC offered laboratory support and helped with discussions about the study. All authors critically reviewed and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Wang K, Xu Z, Wang N, Tian Y, Sun X, Ma Y. Analysis of microRNA and gene networks in human chronic myelogenous leukemia. *Mol Med Rep.* (2016) 13:453–60. doi: 10.3892/mmr.2015.4502
- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol.* (2018) 93:442–59. doi: 10.1002/ajh.25011
- Spagnuolo M, Regazzo G, De Dominicis M, Sacconi A, Pelosi A, Korita E, et al. Transcriptional activation of the miR-17-92 cluster is involved in the growth-promoting effects of MYB in human Ph-positive leukemia cells. *Haematologica.* (2019) 104:82–92. doi: 10.3324/haematol.2018.191213
- Baccarani M, Pane F. A critical history of chronic myeloid leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* (2014) 6:1 doi: 10.4084/MJHID.2014.010
- Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin Hematology.* (2010) 47:302–11. doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.07.001
- Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortes J, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leucemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer.* (2003) 98:437–57. doi: 10.1002/cncr.11520
- Chakraborty C, Sharma AR, Patra BC, Bhattacharya M, Sharma G, Lee SS. MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget.* (2016) 7:42683–97. doi: 10.18632/oncotarget.7977
- Liang L, Wei DM, Li JJ, Luo DZ, Chen G, Dang YW, et al. Prognostic microRNAs and their potential molecular mechanism in pancreatic cancer: a study based on The cancer genome atlas and bioinformatics investigation. *Mol Med Rep.* (2018) 17:939–51. doi: 10.3892/mmr.2017.7945
- Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene.* (2012) 31:4150–63. doi: 10.1038/nc.2011.571
- Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng XH, Lappe JM, Recker RR, et al. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS ONE.* (2014) 9:e97098 doi: 10.1371/journal.pone.0097098
- Guessous F, Velez MA, Marcinkiewicz L, Zhang Y, Kim J, Heister S, et al. Oncogenic effects of miR-10b in glioblastoma stem cells. *J Neurooncol.* (2013) 112:153–63. doi: 10.1007/s11060-013-1047-0
- Garofalo M, Croce CM. Role of microRNAs in maintaining cancer stem cells. *Adv Drug Deliv Rev.* (2015) 81:53–61. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.014
- Li A, Yu J, Kim H, Wolfgang CL, Canto MI, Hruban RH, et al. MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clin Cancer Res.* (2013) 19:3600–10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3092
- Banwait JK, Bastola DR. Contribution of bioinformatics prediction in microRNA-based cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* (2015) 81:94–103. doi: 10.1016/j.addr.2014.10.030
- Gao C, Zhou C, Zhuang J, Liu L, Wei J, Liu C, et al. Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics analysis. *Mol Med Rep.* (2019) 19:362–74. doi: 10.3892/mmr.2018.9636
- Tutscha PJ, Copelan EA, Klein JP. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood.* (1987) 70:1382–8.
- Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med.* (1986) 314:729–35. doi: 10.1056/NEJM198603203141201
- Schmittgen T, Livak K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* (2008) 3:1101–8. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Dweep H, Gretz N. MiRWalk 2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods.* (2015) 12:697. doi: 10.1038/nmeth.3485
- Rokah OH, Geva P, Divon MS, Shpilberg O, Aronov SL. Network analysis of microRNAs, genes and their regulation in diffuse and follicular B-cell lymphomas. *Oncotarget.* (2018) 9:7928–41. doi: 10.18632/oncotarget.23974
- Li X, Xu M, Ding L, Tang J. miR-27a: A novel biomarker and potential therapeutic target in tumors. *J Cancer.* (2019) 10:2836–48. doi: 10.7150/jca.31361
- Song B, Wang Y, Xi Y, Kudo K, Bruheim S, Botchkina G I, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene.* (2009) 28:4065–74. doi: 10.1038/nc.2009.274
- Xia N, Tan WF, Peng QZ, Lai HN. MiR-374b reduces cell proliferation and cell invasion of cervical cancer through regulating FOXM1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2019) 23:513–21. doi: 10.26355/eurrev_2019_01_16863
- Takai T, Tsujino T, Yoshikawa Y, Inamoto T, Sugito N, Kuranaga Y. Synthetic miR-143 exhibited an anti-cancer effect via the downregulation of K-RAS networks of renal cell cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther.* (2019) 27:1017–27. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.03.004
- Zhao L, Li Y, Song X, Zhou H, Li N, Miao Y, et al. Upregulation of miR-181c inhibits chemoresistance by targeting STSIA4 in chronic myelocytic leukemia. *Oncotarget.* (2016) 7:60074–86. doi: 10.18632/oncotarget.11054
- Verghese ET, Drury R, Green CA, Holliday DL, Lu X, Nash C. MiR-26b is down-regulated in carcinoma-associated fibroblasts from ER-positive breast cancers leading to enhanced cell migration and invasion. *J Pathol.* (2013) 231:388–99. doi: 10.1002/path.4248
- Wu X, Chen H, Zhang G, Wu J, Zhu W, Gu Y, et al. MiR-212-3p inhibits cell proliferation and promotes apoptosis by targeting nuclear factor IA in bladder cancer. *J Biosci.* (2019) 44:80. doi: 10.1007/s12038-019-9903-5
- Fiserova B, Kubickova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. The miR-29 family in hematological malignancies. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* (2015) 159:184–91. doi: 10.5507/bp.2014.037
- Wen L, Cheng F, Zhou Y, Yin C. MiR-26a enhances the sensitivity of gastric cancer cells to cisplatin by targeting NRAS and E2F2. *Saudi J Gastroenterol.* (2015) 21:313–9. doi: 10.4103/1319-3767.166206

FUNDING

This study received financial support by São Paulo Research Foundation (FAPESP 2011/50629-7).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01544/full#supplementary-material>

30. Zimmerman EI, Dollins CM, Crawford M, Grant S, Sinkam SPN, Richards KL, et al. Lyn kinase-dependent regulation of miR181 and myeloid cell leukemia-1 expression: Implications for drug resistance in myelogenous leukemia. *Mol Pharmacol.* (2010) 78:811–7. doi: 10.1124/mol.110.0.66258
31. Yu Y, Yang L, Zhao M, Zhu S, Kang R, Vernon P, et al. Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia.* (2012) 26:1752–60. doi: 10.1038/leu.2012.65
32. Venturini L, Battmer K, Castoldi M, Schultheis B, Hochhaus A, Muckenthaler MU, et al. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood.* (2007) 109:4399–405. doi: 10.1182/blood-2006-09-045104
33. Song B, Yan J, Liu C, Zhou H, Zheng Y. Tumor suppressor role of miR-363-3p in gastric cancer. *Med Sci Monit.* (2015) 21:4074–80. doi: 10.12659/MSM.896556
34. Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, Holst J, Bonnet ML, Chomel JC, et al. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* (2010) 95:1325–33. doi: 10.3324/haematol.2009.020636
35. Zuo Z, Calin GA, de Paula HM, Medeiros LJ, Fernandez MH, Shimizu M, et al. Circulating microRNAs let-7a and miR-16 predict progression-free survival and overall survival in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* (2011) 118:413–5. doi: 10.1182/blood-2011-01-330704
36. Wang LS, Li L, Li L, Chu S, Shiang KD, Li M, et al. MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors. *Blood.* (2015) 125:1302–13. doi: 10.1182/blood-2014-06-581926
37. Mou T, Xie F, Zhong P, Hua H, Lai L, Yang Q, et al. MiR-345-5p functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by directly targeting CCL8. *Biomed Pharmacother.* (2019) 111:891–900. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.121
38. Hannafon BN, Cai A, Calloway CL, Xu YF, Zhang R, Fung KM, et al. miR-23b and miR-27b are oncogenic microRNAs in breast cancer: evidence from a CRISPR/Cas9 deletion study. *BMC Cancer.* (2019) 19:642. doi: 10.1186/s12885-019-5839-2
39. Ji R, Zhang X, Gu H, Ma J, Wen X, Zhou J, et al. miR-374a-5p: A new target for diagnosis and drug resistance therapy in gastric cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* (2019) 18:320–31. doi: 10.1016/j.omtn.2019.07.025
40. Xia J T, Chen L Z, Jian W H, Wang K B, Yang Y Z, He W L. MicroRNA-362 induces cell proliferation and apoptosis resistance in gastric cancer by activation of NF- κ B signaling. *J Transl Med.* (2014) 12:33. doi: 10.1186/1479-5876-12-33
41. Chadrashekar K, Jayaram S. Role of *let-7* family microRNA in breast cancer. *Non-Cod RNA Res.* (2016) 1:77–82. doi:10.1016/j.ncrna.2016.10.003
42. Sun GL, Li Z, Wang WZ, Chen Z, Zhang L, Li Q. miR-324-3p promotes gastric cancer development by activating Smad4-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Gastroenterol.* (2018) 53:725–39. doi: 10.1007/s00535-017-1408-0
43. Choe MH, Yoon Y, Kim J, Hwang SG, Han YH, Kim JS. miR-550a-3-5p acts as a tumor suppressor and reverses BRAF inhibitor resistance through the direct targeting of YAP. *Cell Death Dis.* (2018) 9:640. doi: 10.1038/s41419-018-0698-3
44. Pan L, Zhou L, Yin W, Bai J, Liu R. miR-125a induces apoptosis, metabolism disorder and migration impairment in pancreatic cancer cells by targeting Mfn2-related mitochondrial fission. *Int J Oncol.* (2018) 53:124–136. doi: 10.3892/ijo.2018.4380
45. Ni S, Weng W, Xu M, Wang Q, Ian C, Sun H. miR-106b-5p inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting CTSA. *Oncotargets Ther.* (2018) 11:3835–45. doi: 10.2147/OTT.S172887
46. Xue J, Yang M, Hua L-H, Wang Z-P. MiRNA-191 functions as an oncogene in primary glioblastoma by directly targeting NDST1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2019) 23:6242–9. doi: 10.26355/eurrev_201907_18443
47. Ji WB, Liu X, Luo Y, Zhang WZ. High expression of miR-15b predicts poor prognosis for hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Oncol Rep.* (2016) 36:1901–8. doi: 10.3892/or.2016.4982
48. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, et al. MiR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell.* (2010) 140:652–65. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.007
49. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Curr Mol Med.* (2012) 12:27–33. doi: 10.2174/156652412798376170
50. Zhang H, Jiang L, Sun D, Li J, Tang J. MiR-139-5p: promising biomarker for cancer. *Tumor Biol.* (2015) 36:1355–65. doi: 10.1007/s13277-015-3199-3
51. Li M, Guan X, Sun Y, Mi J, Shu X, Liu F, et al. miR-92a family and their target genes in tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res.* (2014) 323:1–6. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.025
52. Poláková KM, Lopotová T, Klamová H, Burda P, Trněný M, Stopka T, et al. Expression patterns of micro-RNAs associated with CML phases and their disease related targets. *Mol Cancer.* (2011) 10:41. doi: 10.1186/1476-4598-10-41
53. Chen L, Jiang X, Chen H, Han Q, Liu C, Sun M. microRNA-628 inhibits the proliferation of acute myeloid leukemia cells by directly targeting IGF-1R. *Oncotargets Ther.* (2019) 12:907–19. doi: 10.2147/OTT.S192137
54. Fallah P, Amirizadeh N, Poopak B, Toogeh G, Arefian E, Kohram F, et al. Expression pattern of key microRNAs in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Int J Lab Hematol.* (2015) 37:560–8. doi: 10.1111/ijlh.12351
55. Zheng J, Zhou Y, Li XJ, Hu JM. MiR-574-3p exerts as a tumor suppressor in ovarian cancer through inhibiting MMP3 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2019) 23:6839–48. doi: 10.26355/eurrev_201908_18723
56. Zearo S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG, et al. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer.* (2014) 14:200. doi: 10.1186/1471-2407-14-200
57. Guo LH, Li H, Wang F, Yu J, He JS. The tumor suppressor roles of miR-433 and miR-127 in gastric cancer. *Int J Mol Sci.* (2013) 14:14171–84. doi: 10.3390/ijms140714171
58. Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol.* (2012) 5:13. doi: 10.1186/1756-8722-5-13
59. Chen J, Gao S, Wang C, Wang Z, Zhang H, Huang K, et al. Pathologically decreased expression of miR-193a contributes to metastasis by targeting WT1-E-cadherin axis in non-small cell lung cancers. *J Exp Clin Cancer Res.* (2016) 35:173. doi: 10.1186/s13046-016-0450-8
60. Wang H, He H, Yang C. miR-342 suppresses the proliferation and invasion of acute myeloid leukemia by targeting Naa10p. *Artif Cell Nanomed Biotechnol.* (2019) 47:3671–6. doi: 10.1080/21691401.2019.1596930
61. Ravichandran K, Sekar D, Subramanian G, Devanathan S. Role of microRNA-7-1-3p in prostate cancer progression. *HIV Adv Res Dev.* (2014) 1:1–4. doi: 10.14437/HARDOA-1-103
62. Pan JY, Zhang F, Sun CC, Li SJ, Li G, Gong FY, et al. miR-134: A humancancer suppressor? *Mol The Nucl Acids.* (2017) 6:140–9. doi:10.1016/j.omtn.2016.11.003
63. Zhang C, Wang B, Wu L. MicroRNA-409 may function as a tumor suppressor in endometrial carcinoma cells by targeting Smad2. *Mol Med Rep.* (2019) 19:622–8. doi: 10.3892/mmr.2018.9642
64. Agirre X, Velasco AJ, Enériz ESJ, Garate L, Bandrés E, Cordeu L, et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol Cancer Res.* (2008) 6:1830–40. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0167
65. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes Cancer.* (2013) 4:342–59. doi: 10.1177/1947601913507951
66. Meister M, Tomasovic A, Banning A, Tikkanen R. Mitogen-activated protein (MAP) kinase scaffolding proteins: a recount. *Int J Mol Sci.* (2013) 14:4854–84. doi: 10.3390/ijms14034854
67. Dhillion AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* (2007) 26:3279–90. doi: 10.1038/sj.onc.1210421
68. Rocca S, Carrà G, Poggio P, Morotti A, Brancaccio M. Targeting few to help hundreds: JAK, MAPK and ROCK pathways as druggable targets in atypical chronic myeloid leukemia. *Mol Cancer.* (2018) 17:40. doi: 10.1186/s12943-018-0774-4

69. Zhang F, Cheong JK. The renewed battle against RAS-mutant cancers. *Cell Mol Life Sci.* (2016) 73:1845–58. doi: 10.1007/s00018-016-2155-8
70. Wang AS, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D, et al. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* (2015) 123:2645–52. doi: 10.1182/blood-2014-02-553800

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The handling editor declared a shared affiliation, though no other research collaboration, with the authors.

Copyright © 2020 Martins, Moraes, Cury, Dadalto, Capannacci, Carvalho, Nogueira, Hokama and Hokama. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Mir-125a-3p e Mir-320b diferencialmente expressos em pacientes com
Leucemia Mieloide Crônica Tratados com TCPH-alo e Mesilato de Imatinibe**

Juliana Ravelli Baldassarre Martins¹, Leonardo Nazario de Moraes², Sarah Santiloni Cury³, Juliane Dadalto¹, Juliana Capannacci¹, Robson Francisco Carvalho³, Célia Regina Nogueira¹, Newton Key Hokama¹, Paula de Oliveira Montandon Hokama¹

¹Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMB-UNESP), Botucatu, SP, Brasil

²Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (FCA-UNESP), Botucatu, SP, Brasil

³Departamento de Biologia Funcional e Estrutural, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (IBB-UNESP), Botucatu, SP, Brasil

Resumo

A leucemia mieloide crônica (LMC), caracterizada pela presença da translocação entre os genes BCR e ABL, gerando o cromossomo Filadélfia, se tornou um paradigma na oncologia através do uso terapêutico exitoso de drogas alvo-específicas. Entretanto, o único tratamento a promover a cura da doença é o TCPH-alo (transplante de células progenitoras hematopoiéticas alogênico), mas algumas dificuldades, como encontrar doador compatível e as altas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a este procedimento, limitam a sua utilização. Atualmente, os inibidores de tirosina quinase (ITQ) são as drogas de escolha para o tratamento dos pacientes com LMC, sendo que o mesilato de imatinibe é usado como primeira linha de tratamento. Apesar da eficácia dos ITQs, alguns pacientes desenvolvem resistência a esse tratamento, o que pode estar relacionado a mutações ou a outros mecanismos, ainda pouco esclarecidos. Assim, os microRNAs ganham um papel de destaque na oncologia por serem reguladores pós-transcricionais da expressão gênica e desempenhar a função de biomarcadores. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de miRNAs de pacientes com LMC-Fase Crônica (LMC-FC) tratados com TCPH-alo e tratados com mesilato de imatinibe. Foram analisadas amostras de sangue periférico de 28 pacientes portadores de LMC-FC. Análises de expressão foram realizadas para 758 miRNAs por RT-qPCR. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática para análises dos dados. Desta forma, foi possível encontrar um perfil de miRNAs e seus possíveis genes alvos e vias alvos nos grupos de pacientes estudados. Entre os resultados, o miR-125a-3p destacou-se entre os miRNAs com baixa expressão, mostrando uma rede de interação com 52 genes alvos. O miR-320 foi o único miRNA super expresso encontrado, com uma rede de interação com 26 genes. Os resultados deste trabalho podem contribuir para estudos futuros sobre a relação dos miRNAs e o prognóstico na LMC.

Palavras-chave: Fosfatases da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno, Leucemia Mieloide Crônica, Biomarcadores, MicroRNAs, MiR-125a-3p, MiR-320b

Introdução

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa com incidência em adultos de 1 a 2 casos em cada 100.000 habitantes (1). Em 1845, a LMC foi a primeira leucemia a ser descrita na literatura (2). A doença ocorre devido à uma translocação entre o gene ABL localizado no cromossomo 9 e o gene BCR do cromossomo 22, o que gera o cromossomo Filadélfia. O gene BCR-ABL1 formado codifica uma oncoproteína com atividade de tirosina quinase exacerbada (3).

Os inibidores de tirosina quinase (ITQs) são drogas terapêuticas alvo específicas utilizadas para tratamento da LMC. O mesilato de imatinibe é considerado um ITQ de primeira geração e atua como inibidor competitivo do sítio do ATP na proteína BCR-ABL1, bloqueando sua atividade tirosina quinase ao impedir que o substrato seja fosforilado. Este bloqueio evita a transdução de sinais necessários para a proliferação celular (4). Apesar de ser uma medicação eficaz, o único tratamento que promove a cura da doença ainda é o transplante de células hematopoiéticas progenitoras alogênicas (TCPH-alo), o qual é indicado para pacientes que não respondem ao tratamento com ITQs (5). Apesar da alta efetividade dos ITQs, 10 a 15% dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe desenvolvem resistência ao tratamento (6).

O tratamento com ITQs é monitorado através da resposta molecular do paciente, baseada nos resultados de RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa) que quantifica o transcrito BCR-ABL1. Valores de BCR-ABL1 $\leq 1\%$ é equivalente à remissão citogenética completa (RCC). Valores de BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$ é definido como resposta molecular maior (RMM ou RM³) e valores de BCR-ABL1 $\leq 0,01\%$ ou doença indetectável é definido como RM⁴ (6). Segundo as recomendações do European LeukemiaNet (ELN 2020), o monitoramento do transcrito BCR-ABL1 deve ser de 3 em 3 meses. Após um ano de tratamento com ITQ é considerado como resposta ótima, níveis de BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$. Pacientes que não atingem RMM após 12 meses de tratamento ou perdem esta resposta em qualquer momento do tratamento devem ser acompanhados e monitorados quanto a resistência terapêutica de acordo com as recomendações ELN 2020 (6).

A resistência ao tratamento pode ser classificada em resistência primária, onde o paciente evolui com refratariedade ao tratamento e resistência secundária ou adquirida, onde o clone leucêmico reaparece após resposta inicial à doença, ou seja, ocorre perda da resposta ao longo do tratamento e recaída (7). Diante dos casos de resistência, estudos têm sido realizados e avanços recentes na tecnologia dos mecanismos de expressão gênica mostraram que os miRNAs são possíveis marcadores prognósticos em diversos tipos de câncer (8-10). MiRNAs são pequenos RNAs não codificadores de proteínas que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (11).

Recentemente diversos estudos mostraram o potencial dos miRNAs como reguladores de processos fisiológicos e patológicos. Em trabalhos sobre o câncer, observou-se que alguns miRNAs desregulados podem levar a alterações como proliferação celular, angiogênese, crescimento tumoral e metástase em diversos tipos de câncer, doença em que todas as vias chave têm uma associação com alterações de miRNAs (12). MiR-10b, miR-31, miR-21, miR-15b e família miR-200 estão relacionados à invasão e metástase. MiR-34a, miR-185, miR-15 e miR-16 são citados como envolvidos em mecanismos que não permitem que as células tumorais sofram apoptose e miR-21, miR-155 e miR-15b são citados na literatura como associados à instabilidade genômica (13-15).

O rápido desenvolvimento das tecnologias informatizadas como a bioinformática têm contribuído significativamente nas pesquisas sobre câncer, com a descoberta dos mecanismos moleculares das doenças. Ao explorar estes mecanismos, é possível encontrar biomarcadores que podem auxiliar no diagnóstico, tratamento e prognóstico do câncer (16). O objetivo deste estudo foi encontrar um perfil de miRNAs e seus genes alvos em pacientes portadores de LMC submetidos ao transplante de medula óssea e pacientes com LMC-Fase Crônica tratados com mesilato de imatinibe, ambos em remissão citogenética e acima de 12 meses de tratamento.

Metodologia

Pacientes e amostras

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Amaral Carvalho de Jau-SP (CEPHAC – 2.917.389). Os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) após serem informados sobre o trabalho. Foram incluídos no estudo 28 pacientes diagnosticados com LMC em fase crônica acompanhados no Hospital Dr. Amaral Carvalho. Os pacientes foram divididos em dois grupos: 14 pacientes que alcançaram remissão citogenética completa (cromossomo Filadélfia negativo) pós TCPH-alo e 14 pacientes tratados com mesilato de imatinibe, também em remissão citogenética completa. Os dados clínicos dos pacientes estão representados na **Tabela 1**. Todos os pacientes transplantados receberam BuCy-2 como regime de condicionamento e ciclosporina e metotrexato como profilaxia da doença enxerto *versus* hospedeiro (17,18).

Tabela 1| Dados clínicos dos pacientes

TCPH-alo				
Pacientes	Sexo	Idade	BCR-ABL%	Breakpoint
1	M	37	1,60	b2a2
2	F	44	1,20	b3a2
3	F	03	0,20	b3a2
4	F	63	0,20	b3a2
5	M	37	0,50	b2a2
6	M	43	0,30	b3a2
7	M	48	0,75	b3a2
8	M	35	0,03	b3a2
9	M	42	0,01	b2a2
10	F	42	0,01	b3a2
11	F	56	0,03	b2a2
12	M	32	0,08	b2a2
13	M	21	0,30	b2a2
14	M	58	0,02	b2a2

Mesilato de Imatinibe				
Pacientes	Sexo	Idade	BCR-ABL%	Breakpoint
1	M	60	1,40	b3a2
2	M	57	1,60	b2a2
3	M	53	0,70	b2a2
4	M	50	1,80	b3a2
5	F	37	1,50	b3a2
6	F	59	1,00	b3a2
7	M	38	1,60	b3a2
8	F	50	0,55	b3a2
9	M	25	0,90	b3a2
10	F	52	1,60	b3a2
11	F	42	0,70	b2a2
12	F	63	1,20	b2a2
13	M	65	0,70	b3a2
14	M	56	0,80	b3a2

Extração e purificação de RNA

O RNA total foi isolado a partir de 5 mL de sangue periférico usando o QIAamp® RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a purificação, a quantidade e a qualidade do RNA foram analisados utilizando NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), respectivamente.

Reação de transcrição reversa

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando RNA total. Foi utilizado o Kit de Transcrição Reversa Taqman MicroRNA em combinação com o Megaplex RT Primer Human Pool Set A e B (Thermo Fisher Scientific). Essa reação transcreveu 758 miRNAs e três controles endógenos (U6 snRNA, RNU44 e RNU48). As amostras de cDNA foram armazenadas a -80°C até a análise por RT-qPCR.

PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Foi utilizado o TaqMan® MGB para o RT-qPCR, (PCR quantitativo em tempo real) o qual foi baseado no anelamento específico de cada sonda com sua sequência complementar. Para RT-qPCR, TaqMan® Low Density Array Human MicroRNA Arrays v2.0 (A e B) (ABIV®, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), as análises foram realizadas na plataforma ViiA7 (ABIV®). Um total de 758 miRNAs foram analisados.

Análise de bioinformática

O programa Expression Suite Software Versão 1.1 foi utilizado para identificar miRNAs diferencialmente expressos. Para estudo dos possíveis genes alvos de miRNAs expressos diferencialmente, de acordo com RT-qPCR, foi utilizado o miRWalk 2.0, que inclui dados de previsão de alvos gerados por diferentes algoritmos (incluindo o próprio

algoritmo) (19). Os seguintes algoritmos foram selecionados: miRWalk, miRDB, Micro T4, miRanda, RNAhybrid e Targetscan. Somente alvos previstos por pelo menos 3 dos algoritmos selecionados foram aceitos. Em seguida, foram verificados os alvos previstos anteriormente identificados como expressos diferencialmente usando dados de microarranjo disponíveis no Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), número de acesso GSE43225. Os dados de microarray foram analisados usando o script GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>). Foram considerados genes expressos diferencialmente quando mostraram fold-change de pelo menos 1,5. Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) foi utilizado para procurar termos enriquecidos entre genes expressos diferencialmente expressos usando a correção de Bonferroni e aceitando apenas termos com $p \leq 0,05$. Genes diferencialmente expressos relacionados a miRNAs regulados positivamente e regulados negativamente foram analisados de acordo com o EnrichR (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) para análise de enriquecimento. O Reactome foi utilizado para análises de dados e a avaliação da rede de interação proteína-proteína (PPI), com base em uma lista de genes, foi feita utilizando a ferramenta online STRING versão 11.0 (<https://string-db.org/>). Experiments, databases, co-expression, neighborhood e co-occurrence foram considerados. A pontuação mínima de interação foi de 0,700. O software Cytoscape versão 3.8.0 (<http://www.cytoscape.org>) foi utilizado para visualizar os resultados.

Estatística

Análise de comparação de Ct foi utilizada para quantificar a expressão de miRNAs. As diferenças foram avaliadas estatisticamente pelo teste t de Student. Considerou-se $p < 0,05$ para indicar significância estatística.

Resultados

MiRNAs diferencialmente expressos

Os dados de expressão dos miRNAs estão disponíveis no banco de dados da NCBI GEO, número de acesso GSE 164549. Um total de 758 miRNAs foram analisados pelo arranjo RT-qPCR em amostras de sangue periférico de 14 pacientes com LMC-Fase Crônica tratados com mesilato de imatinibe e 14 pacientes tratados com TCPH-alo, ambos os grupos em remissão citogenética. De acordo com os critérios de corte (fold change $< 0,5$ e fold change $> 2,0$), 43 miRNAs expressos diferencialmente foram identificados a partir deste conjunto de dados de microarrays. Destes miRNAs, 1 apresentou alta expressão e 42 estavam com baixa expressão (**Tabela 2**).

Tabela 2 | MiRNAs diferencialmente expressos

miR Name	miRBase ID	FC	p-value
hsa-miR-20b	MIMAT0001413	0,128	0,000
hsa-miR-502-3p	MIMAT0004775	0,135	0,000
hsa-miR-127	MIMAT0000446	0,143	0,000
hsa-miR-485-3p	MIMAT0002176	0,148	0,000
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	0,174	0,001
hsa-miR-128a	MIMAT0000424	0,174	0,001
hsa-miR-92a	MIMAT0000092	0,188	0,000
hsa-miR-411	MIMAT0003329	0,189	0,034
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	0,200	0,000
mmu-miR-140	MIMAT0000151	0,205	0,015
hsa-miR-218	MIMAT0000275	0,212	0,036
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	0,217	0,001
hsa-miR-30c	MIMAT0000244	0,225	0,003
hsa-miR-23a	MIMAT0000078	0,234	0,003
hsa-miR-598	MIMAT0003266	0,234	0,011
hsa-miR-362	MIMAT0000705	0,288	0,013
hsa-miR-616	MIMAT0004805	0,351	0,017
hsa-miR-331	MIMAT0000760	0,422	0,023
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	0,072	0,000
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	0,089	0,000

hsa-miR-454	MIMAT0003885	0,136	0,001
hsa-miR-323-3p	MIMAT0000755	0,137	0,000
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	0,153	0,000
hsa-let-7c	MIMAT0000064	0,173	0,000
hsa-miR-30b	MIMAT0000420	0,188	0,004
hsa-miR-532	MIMAT0002888	0,207	0,002
hsa-miR-146a	MIMAT0000449	0,233	0,002
hsa-miR-132	MIMAT0000426	0,293	0,004
mmu-miR-491	MIMAT0003486	0,293	0,005
hsa-miR-126	MIMAT0000445	0,328	0,046
hsa-miR-708	MIMAT0004926	0,336	0,017
hsa-miR-191	MIMAT0000440	0,380	0,009
hsa-miR-543	MIMAT0004954	0,141	0,001
hsa-miR-604	MIMAT0003272	0,232	0,011
hsa-miR-548J	MIMAT0005875	0,289	0,028
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	0,142	0,001
hsa-miR-550	MIMAT0004800	0,190	0,000
hsa-miR-151-3p	MIMAT0000757	0,268	0,013
hsa-miR-941	MIMAT0004984	0,292	0,026
hsa-miR-1285	MIMAT0005876	0,357	0,026
hsa-miR-378	MIMAT0000731	0,387	0,018
hsa-miR-589	MIMAT0003256	0,402	0,036
hsa-miR-320b	MIMAT0005792	2,462	0,021

Genes alvos de miRNAs

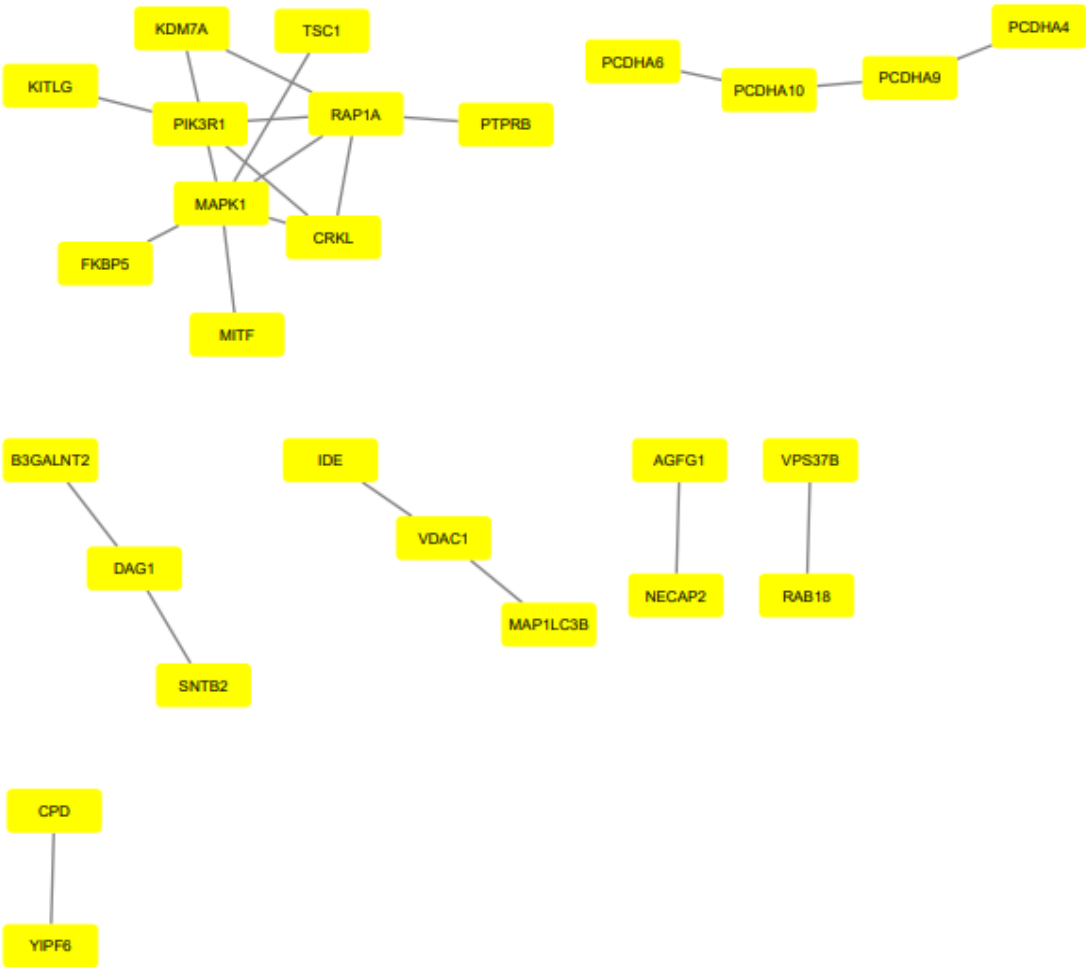
Os miRNAs com alta e baixa expressão foram analisados no miRWalk para identificação de possíveis genes alvos destes miRNAs. A análise identificou 1.171 genes expressos diferencialmente.

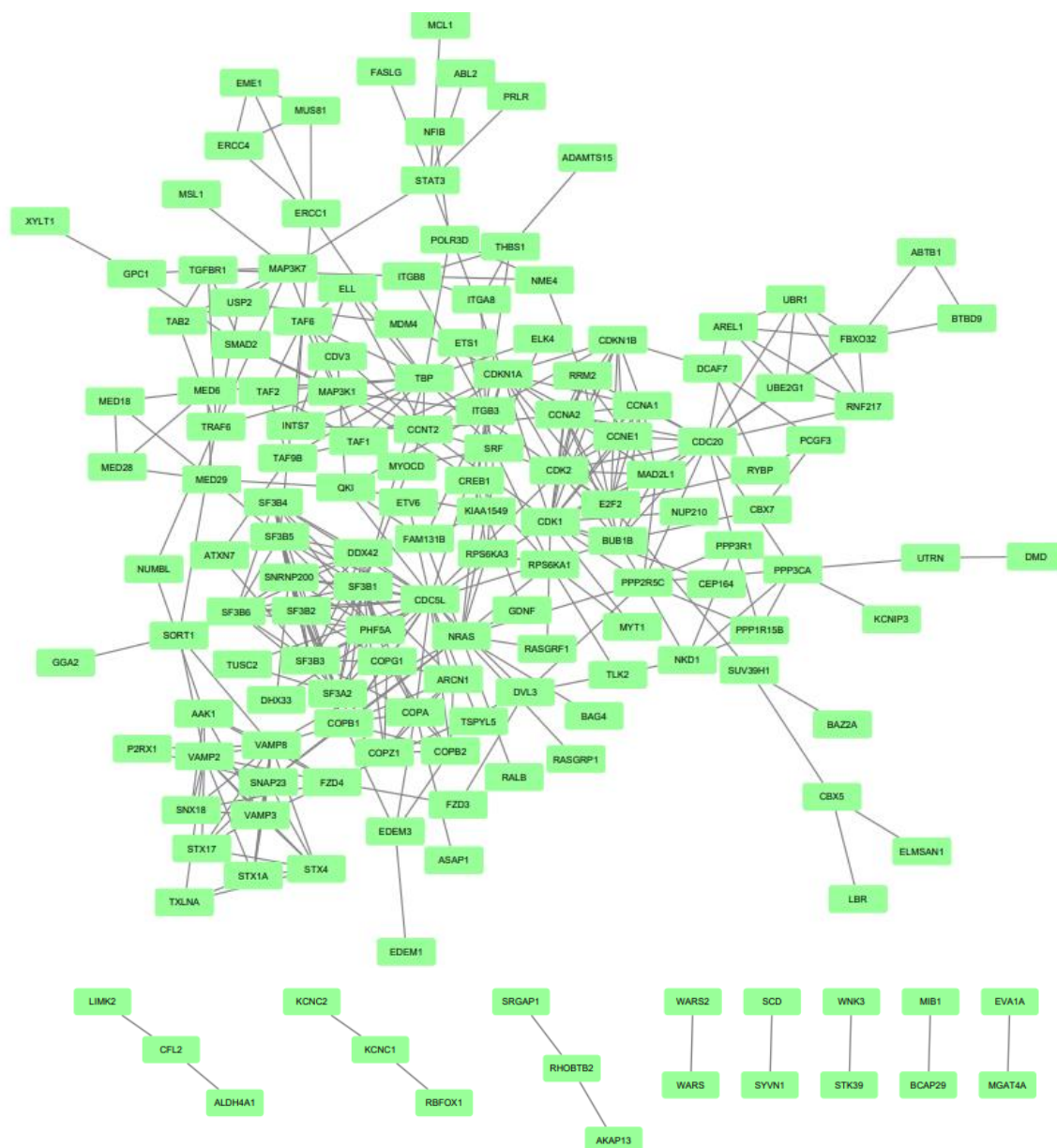
Rede de interação Proteína-Proteína

A ferramenta EnrichR foi utilizada para visualizar as principais vias relacionadas aos genes alvos dos miRNAs encontrados. O programa Reactome mostrou a interpretação biológica e forneceu modelos para visualização dos resultados. A análise pela ferramenta STRING foi realizada nos genes alvos dos miRNAs superexpressos e miRNAs pouco expressos, gerando dados que puderam ser visualizados em figuras geradas pelo

Cytoscape.

Figura 1| Interação proteína-proteína dos genes alvos dos miRNAs com alta expressão. A interação gênica foi realizada com as ferramentas STRING e Cytoscape. Os genes estão representados pelos retângulos amarelos e as linhas representam as associações proteína-proteína.





Diante dos resultados encontrados, foram selecionados os genes que apresentaram maior interação entre si de acordo com as figuras geradas pelo cytoscape. Para estes

genes, considerados como principais, foi realizada análise pelo Gene Ontology para encontrar quais vias estão envolvidas com estes genes. Os principais termos encontrados são mostrados nas **Tabelas 3a e 3b**.

Tabela 3a|Termos enriquecidos gerados pelo Gene Ontology para os principais genes alvos do miRNAs com baixa expressão

Pathway ID	Pathway description	P-value	FDR
GO: 0090304	Nucleic acid metabolic process	2.34E-06	3.72E-02
GO: 0006139	Nucleobase-containing compound metabolic process	1.28E-05	1.01E-01
GO: 0072422	Signal transduction involved in DNA damage checkpoint	1.64E-05	8.69E-02
GO: 0072401	Signal transduction involved in DNA integrity checkpoint	1.64E-05	6.51E-02
GO: 0072395	Signal transduction involved in cell cycle checkpoint	1.71E-05	5.42E-02
GO: 0051329	Mitotic interphase	2.06E-05	5.46E-02
GO: 0051325	Interphase	2.06E-05	4.68E-02
GO: 0046483	Heterocycle metabolic process	2.25E-05	4.46E-02
GO: 0006725	Cellular aromatic compound metabolic process	2.58E-05	4.56E-02
GO: 0016070	RNA metabolic process	3.62E-05	5.75E-02
GO: 0000079	Regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	3.97E-05	5.73E-02
GO: 0000398	mRNA splicing, via spliceosome	4.15E-05	5.48E-02
GO: 0000377	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine	4.15E-05	5.06E-02
GO: 0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	4.31E-05	4.88E-02
GO: 1904029	Regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	4.45E-05	4.71E-02
GO: 0042770	Signal transduction in response to DNA damage	4.71E-05	4.67E-02
GO: 1901360	Organic cyclic compound metabolic process	4.79E-05	4.47E-02
GO: 0072331	Signal transduction by p53 class mediator	7.11E-05	6.27E-02
GO: 0034641	Cellular nitrogen compound metabolic process	7.56E-05	6.31E-02
GO: 0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle	8.56E-05	6.79E-02

Top 20 GO terms with a lower P-value in Biological Process. GO, Gene Ontology; FDR, false discovery rate

Tabela 3b|Termos enriquecidos gerados pelo Gene Ontology para os principais genes alvos do miRNA com alta expressão

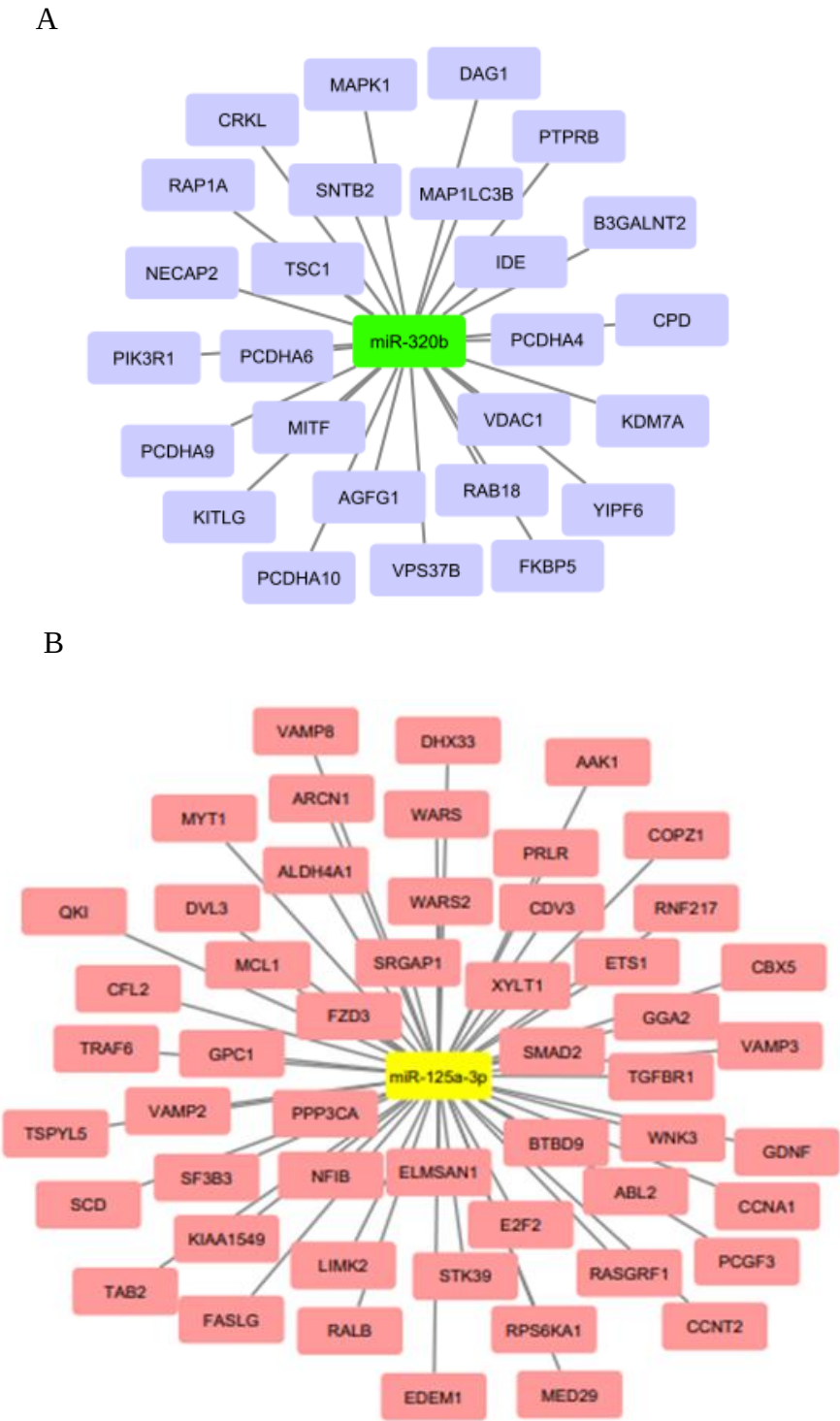
Pathway ID	Pathway description	P-value	FDR
GO: 0000186	Activation of MAPK activity	2.25E-07	3.58E-03
GO: 1903827	Regulation of cellular protein localization	2.74E-06	2.17E-02
GO: 1901699	Cellular response to nitrogen compound	4.93E-06	2.61E-02
GO: 0050952	T cell receptor signaling pathway	6.78E-06	2.69E-02
GO: 0050778	Positive regulation of immune response	7.60E-06	2.41E-02
GO: 1905475	Regulation of protein localization to membrane	8.82E-06	2.33E-02
GO: 0060341	Regulation of cellular localization	1.34E-05	3.03E-02
GO: 0043549	Regulation of kinase activity	1.80E-05	3.57E-02
GO: 0032880	Regulation of protein localization	2.19E-05	3.85E-02
GO: 1902533	Positive regulation of intracellular signal transduction	2.74E-05	4.35E-02
GO: 0051338	Regulation of transferase activity	2.90E-05	4.18E-02
GO: 0050851	Antigen receptor-mediated signaling pathway	3.00E-05	3.97E-02
GO: 0002684	Positive regulation of immune system process	3.16E-05	3.86E-02
GO: 1901701	Cellular response to oxygen-containing compound	3.38E-05	3.83E-02
GO: 1901698	Response to nitrogen compound	3.57E-05	3.78E-02
GO: 0032147	Activation of protein kinase activity	3.83E-05	3.80E-02
GO: 0046326	Positive regulation of glucose import	3.94E-05	3.68E-02
GO: 0050776	Regulation of immune response	4.26E-05	3.76E-02
GO: 0071495	Cellular response to endogenous stimulus	4.44E-05	3.71E-02
GO: 0042307	Positive regulation of protein import into nucleus	4.53E-05	3.60E-02

Top 20 GO terms with a lower P-value in Biological Process. GO, Gene Ontology; FDR, false discovery rate

Os principais genes alvos do miRNA com alta expressão, principais genes alvo dos miRNAS com baixa expressão e seus respectivos miRNAS relacionados são mostrados na **Figura 3**.

A partir do perfil de miRNAs identificado, destacamos dois microRNAs: o miRNA 320-b, o único com alta expressão e o miRNA 125a-3p, que dentre os de baixa expressão foi aquele que apresentou maior intreração gênica. As **Figuras 4a e 4b** representam uma análise comparativa dos valores de expressão destes miRNAs entre os grupos estudados, estabelecendo o grupo do transplante como controle.

Figura 3|Principais genes alvos do miRNA com alta expressão (A). Principais genes alvos dos miRNAS com baixa expressão (B)



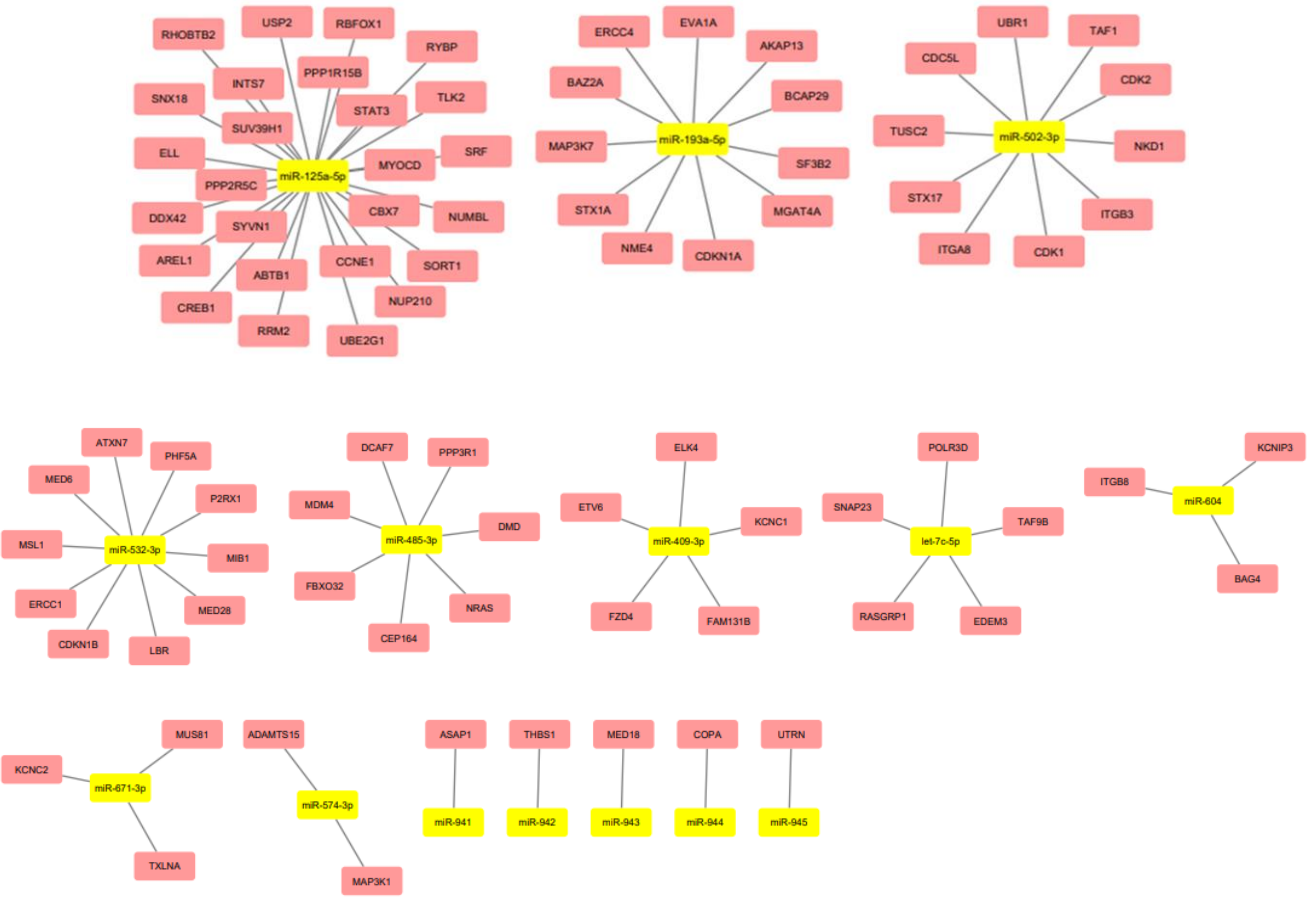


Figura 4a| Comparação entre os valores de *fold change* do miR-320-b (alta expressão) entre os pacientes tratados com TCPH-alo e mesilato de imatinibe.

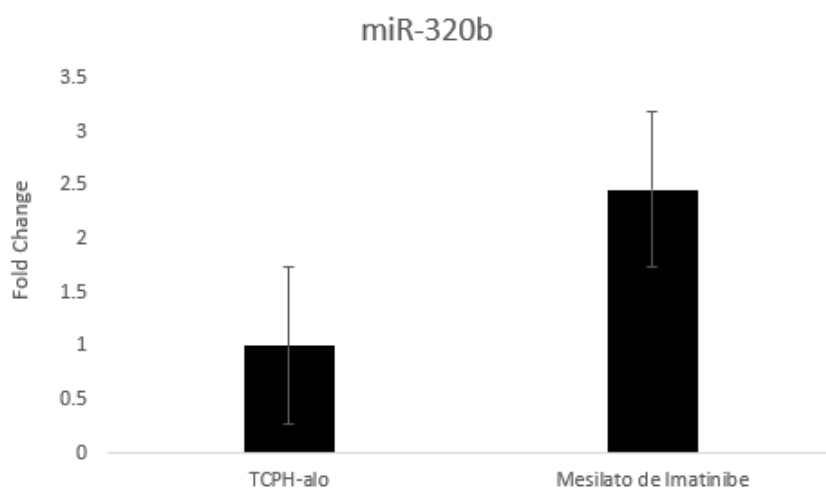
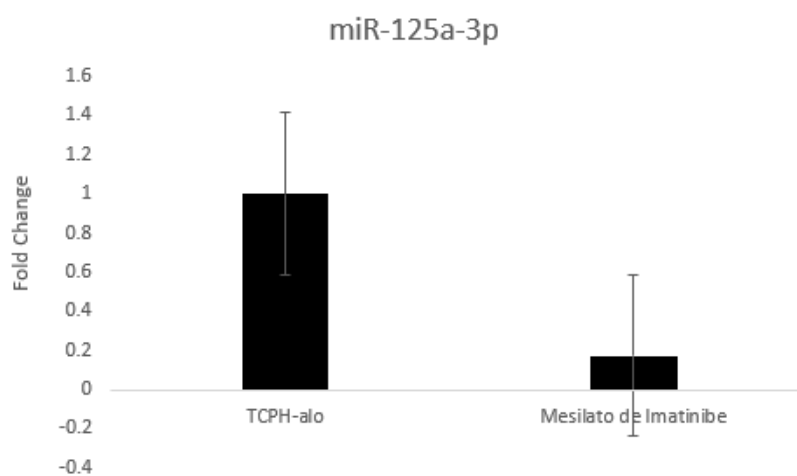


Figura 4b| Comparação entre os valores de *fold change* do miR-125a-3p, principal miRNA com baixa expressão encontrado entre os pacientes tratados com TCPH-alo e mesilato de imatinibe.



Discussão

O TCPH-alo foi o primeiro tratamento em pacientes com LMC que erradicou o cromossomo Filadélfia. Neste processo, após altas doses de quimioterapia, as células progenitoras hematopoiéticas transplantadas são capazes de restabelecer a hematopoiese (20). Atualmente, o TCPH-alo é o único tratamento disponível que pode levar os pacientes portadores de LMC à cura, porém, as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a esse tratamento são muito altas, além da dificuldade para encontrar doador (21-24). Em estudo realizado com pacientes portadores de LMC com idade entre 50 e 59 anos, a taxa de mortalidade pós transplante foi de 20% (21). Portanto, após o advento dos ITQs, o TCPH-alo passou a ser utilizado para tratamento da LMC apenas nos casos de pacientes que desenvolvem resistência terapêutica (25).

O primeiro ITQ aprovado para uso foi o mesilato de imatinibe (26,27), um potente inibidor da tirosina quinase (28-30). Entretanto, 10 a 15% dos pacientes em fase crônica da LMC não evoluem favoravelmente com o uso do mesilato de imatinibe devido à resistência ou intolerância ao tratamento (31,32). Apesar dos avanços em relação ao tratamento da LMC, atualmente, este assunto ainda requer elucidação dos mecanismos chave que envolvem a resistência e/ou falha às estratégias terapêuticas efetivas (33). O estudo dos miRNAs tem colaborado para a descoberta destes possíveis mecanismos.

Nos últimos anos muitos estudos realizados trouxeram grande conhecimento sobre o papel dos miRNAs nos processos fisiológicos e patológicos (34). Estes pequenos RNAs podem ser identificados no sangue periférico e utilizados como biomarcadores de diversas doenças (35,36). Evidências indicam que os miRNAs têm envolvimento direto no desenvolvimento mieloide e na leucemogênese (37).

Além dos miRNAs, a bioinformática também tem contribuído para o entendimento de processos ligados ao desenvolvimento e progressão da LMC, colaborando com a descoberta de possíveis marcadores para a doença. Estudos recentes mostram aumento das evidências sobre a interação entre genes e proteínas, que levam a investigações dos mecanismos moleculares do câncer. Neste contexto, a bioinformática é essencial para integrar sistemas biológicos e ciência computacional, auxiliando no

diagnóstico, terapia e prognóstico do câncer e de outras doenças. (38)

Em nosso estudo comparamos dois grupos de pacientes com LMC, sendo que o tratamento realizado no primeiro grupo foi o TCPH-alo e os pacientes do segundo grupo foram tratados com mesilato de imatinibe. Analisando os miRNAs destes pacientes e utilizando ferramentas de bioinformática, foi possível obter um perfil constituído por 43 miRNAs diferencialmente expressos, sendo 1 com alta expressão e 42 com baixa expressão.

MiRNAs de baixa expressão: miR-125a-3p, miR-485-3p, miR-409-3p e miR-574-3p

Do total de 43 miRNAs diferencialmente expressos encontrados, alguns são relatados na literatura como importantes na patogênese da LMC. Destacaremos o miR-125a-3p, miR-485-3p, miR-409-3p e miR-574-3p, pois apresentaram baixa expressão em nosso estudo e estão relacionados à LMC de acordo com a literatura.

MiR-125a-3p, miR-485-3p e miR-409-3p foram relatados como expressos na LMC em estudo de Xiong e colaboradores, que utilizaram a linhagem celular K562 para estudar a expressão de miRNAs (39).

Estudo de Di Stefano e colaboradores mostrou que o miR-125a com baixa expressão foi detectado em células CD34+ provenientes de pacientes com LMC quando comparadas com as mesmas células derivadas de doadores saudáveis (7). Outro estudo, em que a expressão de miRNAs foi analisada na medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) e na medula óssea de pacientes controle, encontrou-se que o miR-125a estava com baixa expressão nos pacientes com a doença. Dados da literatura mostram que o miR-125a regula o ciclo celular, proliferação e apoptose na LMA (40).

Em relação ao miR-485, a literatura mostra que o mesmo foi encontrado com baixa expressão em linhagens celulares HL60 de LMA quando estas células foram comparadas à células normais do sangue periférico (41). Estudo de Li e colaboradores identificou que o miR-485-3p foi um dos 33 miRNAs diferencialmente expressos em um grupo de pacientes com LMC. Estes achados colaboram significativamente com o

entendimento sobre a patogênese da doença (42).

MiR-409-3p também é um miRNA que se destacou em nossos resultados pois é descrito na literatura com expressão reduzida em linhagens celulares de LMC com metilação CpG-rich (43,44). Em estudo realizado com pacientes com LMA, miR-409-3p em baixa expressão foi associado a alto risco de recaída da doença (45,46).

Além dos miRNAs citados anteriormente, o miR-574-3p, encontrado em nossas amostras com baixa expressão, foi descrito em trabalho com sangue periférico de pacientes com LMC. Observou-se baixa expressão deste miRNA nos pacientes com LMC quando comparou-se as amostras destes pacientes com amostras de controles saudáveis, indicando que o miR-574-3p pode estar envolvido no desenvolvimento e progressão da doença (47).

Estes achados colaboram com o entendimento sobre a patogênese da doença e a persistência de células BCR-ABL1 observado em nossos grupos de pacientes após terapêuticas como o TCPH-alo e ITQs.

CRKL diferencialmente expresso

Ao realizar análise dos genes alvos dos miRNAs de nosso estudo, por meio da ferramenta miRWalk, encontramos 1.117 genes diferencialmente expressos. Nossos dados apontam um gene pouco expresso em nossas amostras, denominado CRKL que, de acordo com as análises de bioinformática, é alvo do miR-320b. A família CRK é composta por cinco membros: v-CRK, CRKI, CRKII, CRKIII e proteína semelhante à CRK (CRKL) (48). As proteínas CRK são substratos de fosforilação para o oncogene de fusão BCR/ABL encontradas em mais de 95% dos casos de LMC. CRKL é uma proteína tirosina fosforilada encontrada em neutrófilos de pacientes com LMC (49). Estes dados corroboram com o fato dos pacientes avaliados se encontrarem em remissão citogética.

Vias MAPK e NRAS

Após análise dos genes alvos, utilizamos o Gene Ontology para análise de enriquecimento de vias destes genes e estudo das principais vias relacionadas a estes genes. Algumas vias encontradas se destacaram por serem fundamentais para o desenvolvimento da LMC, como regulação da atividade da proteína quinase, processos relacionados à divisão celular e atividade da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno).

A via MAPK é uma importante cascata de sinalização encontrada em diversos tipos de câncer (50) e desempenha papel central na LMC, pois é necessária para a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular (51,52). Em nossos resultados encontramos alta expressão dos genes MAP3K1 e MAP3K7. Estes genes são membros da família das MAPK (53,54). O gene MAP3K1 está envolvido no processo de sobrevivência e migração de células tumorais (55) e o gene MAP3K7 é um importante regulador de vias celulares associadas à proliferação celular em câncer (54). O gene NRAS também foi encontrado com alta expressão em nosso estudo. A família RAS é composta por três genes associados à carcinogênese: HRAS, KRAS e NRAS (56). Mutações em NRAS são frequentemente encontradas em desordens mieloides, como a LMC (57). MAPK e NRAS foram encontrados com alta expressão em nosso estudo, sendo sugestivo de atividade tumoral.

Este estudo buscou explorar por meio de ferramentas de bioinformática o perfil de miRNAs, seus genes alvos e vias relacionadas em pacientes com LMC em tratamento. Redes de interação proteína-proteína foram construídas para relacionar os miRNAs encontrados com seus genes alvos e foi possível obter alguns dados que corroboram com estudos descritos na literatura. Alguns fatores limitaram este estudo. Por se tratar de um estudo com dados de mundo real, as amostras eram escassas, o que não permitiu uma segunda rodada de RT-qPCR para validação dos resultados, além do alto custo dos reagentes. Novos estudos são necessários para a melhor compreensão do papel dos miRNAs, genes e vias alvos em pacientes com LMC. Acreditamos na contribuição deste estudo para a literatura científica por se tratar de dados *in vivo*, voltados ao seguimento

de pacientes com LMC em tratamento.

Agradecimentos

Agradecemos ao Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital Dr. Amaral Carvalho, especialmente ao seu coordenador, Dr. Vergílio Antônio Renzi Colturato pelo apoio e oportunidade, ao Sr. Anderson João Simoni, analista de dados, pela sua disponibilidade e aos pacientes pela entrega e ensinamentos contínuos.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Fundação de apoio à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP 2011/50629-7).

Referências

1. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol* (2018) 93:442-459. doi: 10.1002/ajh.25011
2. Goldman J M. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin Hematol* (2010) 47(4):302-311. doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.07.001
3. Spagnuolo M, Regazzo G, De Dominici M, Sacconi A, Pelosi A, Korita E, et al. Transcriptional activation of the miR-17-92 cluster is involved in the growth-promoting effects of MYB in human Ph-positive leukemia cells. *Haematologica* (2019) 104(1):82-92. doi:10.3324/haematol.2018.191213
4. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate – A new oral targeted therapy. *N Engl J Med* (2002) 346:683-693. doi: 10.1056/NEJMMra013339
5. Zhang GF, Zhou M, Bao XB, Qui HY, Li Z, Xue SL. Imatinib mesylate versus allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* (2016) 17(9) 4477-4481.
6. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020; 34:966-984
7. Cardama AQ, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary

resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* (2009) 16(2) 122-131. doi: 10.1590/S1516

8. Liang L, Wei DM, Li JJ, Luo DZ, Chen G, Dang YW, et al. Prognostic microRNAs and their potential molecular mechanism in pancreatic cancer: a study based on The Cancer Genome Atlas and bioinformatics investigation. *Mol Med Rep* (2018) 17:939-951. doi:10.3892/mmr.2017.7945

9. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene* (2012) 31:4150-4163. doi:10.1038/onc.2011.571

10. Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng XH, Lappe JM, Recker RR, et al. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* (2014) 9(5):e97098 doi:10.1371/journal.pone.0097098

11. Cheng G. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Reviews* (2015) 81:75-93. doi: 10.1016/j.addr.2014.09.001

12. Forterre A, Komuro H, Aminova S, Harada M. A comprehensive review of cancer microRNA therapeutic delivery strategies. *Cancers* (2020) 12:1852. doi: 10.3390/cancers12071852

13. Berindan-Neagoe I, Monroig P e C, Pasculli B, Calin G.A. MicroRNAome genome: A treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J. Clin.* (2014) 64, 311–336. doi: 10.3322/caac.21244

14. Di Leva G, Garofalo M, Croce C.M. MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* (2014) 9, 287–314. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104715

15. Shah M.Y, Ferrajoli A, Sood A.K, Lopez-Berestein G, Calin G.A. MicroRNA Therapeutics in Cancer-An Emerging Concept. *EBioMedicine* (2016) 12, 34–42. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.017

16. Gao C, Zhou C, Zhuang J, Liu L, Wei J, Liu C. Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics analysis. *Mol Med Rep* (2019) 19:362-374. doi: 10.3892/mmr.2018.9636

17. Tutscha PJ, Copelan EA, Klein JP. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* (1987) 70:1382-1388
18. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med* (1986) 314:729-735. doi: 10.1056/NEJM198603203141201
19. Dweep H, Gretz N. MiRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* (2015) 12(8): 697. doi:10.1038/nmeth.3485
20. Pavlu J, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* 2011; 117(3):755-763
21. Baccarani M, Deininger M, Rosti A, et al. European LeukemiaNet 2013 recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2013; 122:885-892
22. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leucemia: na update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; 27:6041-6051
23. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108:1809-1820
24. Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J. The role of hematopoietic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2015; 94 Suppl 2:S177-S186.
25. Soyer N, Uysal A, Tombuloglu M, Sahin F, Saydam G, Vural F. Allogeneic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia patientes: single center experience. *World J Hematol* 2017; 6(1):1-10
26. O'Brien SG, Guilhot F, Larson R, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348-994-1004
27. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, et al. Six-year follow up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leucemia. *Leukemia* 2009;

23:1054-1061

28. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996; 56:100-104

29. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; 2:561-566

30. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295:139-145

31. Yang H, Zhang J, Li J, Zhao F, Shen Y, Xing X. Overexpression of miR-574-3p suppresses proliferation and induces apoptosis of chronic myeloid leukemia cells via targeting IL6/JAK/STAT 3 pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine* 16:4296-4302, 2018

32. Lübking A, Dreimane A, Sandin F, Isaksson C, et al. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in the TKI era: population-based data from the Swedish CML registry. *Bone Marrow Transplantation* (2019) 54:1764-1774

33. Innes AJ, Milojkovic D, Apperley JF. Allogeneic transplantation for CML in the TKI era: striking the right balance. *Nature reviews. Clin Oncol.* 2016;13:79-91

34. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835-40

35. Zhi F, Cao X, Xie X, Wang B, Dong W, Gu W, et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leucemia. *PloS One* 2013;8:e56718

36. Fayyad-Kazan H, Bitar N, Najar M, Lewalle P, Fayyad-Kazan M, Badran R, et al. Circulating miR-150 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia. *J Transl Med* 2013;11:31

37. Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005;123:819-31

38. Wu D, Rice CM, Wang X. Cancer bioinformatics: A new approach to systems

clinical medicine. *BMC Bioinformatics* 2012 13:71

39. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase signal transduction in solid tumors. *Genes Cancer*. 2013;4:342-359. doi: 10.1177/1947601913507951
40. Ufkin ML, Peterson S, Yang X, Driscoll H, Duarte C, Sathyanarayana P. MiR-125a regulates cell cycle, proliferation and apoptosis by targeting the ErbB pathway in acute myeloid leucemia. *Leuk Res* (2014) 38(3):402-410
41. Valiollahi E, Behravan J. Leukemogenesis associated miRNAs regulate OSKM and Tp53 genes. *Biomed Res* (2016) 376-383
42. Li H, Liu L, Zhuang J, Liu C, Zhou C, Yang J. Identification of key candidate targets and pathways for the targeted treatment of leukemia stem cells of chronic myelogenous leukemia using bioinformatic analysis. *Mol Genet Genomic Med* (2019) 7:e851
43. Verma M, Karimiani EG, Byers RJ, Rehman S, Westerhoff HV and Day PJ. Mathematical modelling of miRNA mediated BCR.ABL protein regulation in chronic myeloid leukaemia vis-avis therapeutic strategies. *Integr Biol (Camb)* 2013; 5: 543-554
44. Li Q, Wu Y, Zhang J, Yi T, Li W. MicroRNA-130a regulates cell malignancy by targeting RECK in chronic myeloid leukemia. *Am J Transl Res* (2016) 8(2):955-967
45. Liao Q, Wang B, Li X, Jiang G. MiRNAs in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* (2017) 8(2):3666-3682
46. Diaz-Beya M, Brunet S, Nomdedeu J, Tejero R, Diaz T, Pratcorona M, et al. MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014; 28(4):804-812
47. Yang H, Zhang J, Li J, Zhao F, Shen Y, Xing X. Overexpression of miR-574-3p suppresses proliferation and induces apoptosis of chronic myeloid leukemia cells via targeting IL6/JAK/STAT3 pathway. *Exp Ther Med* (2018) 16:4296-4302
48. Lui X, Jiang L, Wang A, Yu J, Shi F, Zhou X. MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer letters* 2009, 286:217-22
49. Keramatinia A, Ahadi A, Akbari ME, Mohseny M, Jarahi AM, Bahadori-Monfared, A. The roles of DNA epigenetics and clinical significance in Chronic myeloid

Leukemia: a review. *Cell Mol Biol* (2018) 64(9):58-63

50. Xiong Q, Yang Y, Wang H, Li J, Wang S, Li Y, et al. Characterization of miRNomes in acute and chronic myeloid leucemia cell line. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12 (2014) 79-91

51. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802:396-405

52. Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nichida E. ERK MAP Kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci*. 2006;97:697-702

53. Araujo EG, Bianchi C, Faro R, Sellke FW. Oscillation in the activities of MEK/ERK 1/2 during cardiopulmonar by-pass in pigs. *Surgery* 2001, 130(2):182-91

54. Zhou LL, Dong JL, Huang G, Sun ZL, Wu J. MicroRNA-143 inhibits cell growth by targeting ERK5 and MAP3K7 in breast cancer. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(8):e5891

55. Pham TT, Angus SP, Johnson GL. MAP3K1: Genomic alterations in cancer and function in promoting cell survival or apoptosis. *Genes & Cancer* 4(11-12)419-426, 2013

56. Rocca S, Carrà G, Poggio P, Morotti A, Brancaccio M. Targeting few to help hundreds: JAK, MAPK and ROCK pathways as druggable targets in atypical chronic myeloid leucemia. *Mol Cancer* (2018) 17:40

57. Wang As, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D, et al. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplaastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* (2015)123:2645-52

O perfil de expressão de miRNAs foi identificado em amostras de sangue periférico de 42 pacientes portadores de LMC. Os genes alvos destes miRNAs e possíveis vias envolvidas foram detectados através de ferramentas de bioinformática: Expression Suite Software Versão 1.1, miRWalk, Gene Expression Omnibus (GEO), GEO2R, Gene Ontology, EnrichR, String e Cytoscape.

(1) Comparação dos grupos de pacientes com LMC recém diagnosticados que não iniciaram tratamento versus pacientes com LMC tratados com transplante de medula óssea. Neste grupo foram encontrados 46 miRNAs diferencialmente expressos, sendo 16 com alta expressão e 30 com baixa expressão. Os microRNAs: miR-10a, cluster miR-17/92, miR-328, miR-150, miR-486, miR-181c, miR-30, let-7g e miR-16, descritos e relacionados à LMC pela literatura, foram encontrados em nosso estudo. Os demais miRNAs identificados nestes grupos de estudo foram descritos e associados à leucemia mieloide crônica pela primeira vez. São eles: miR-1260, miR-27a-3p, miR-140-3p, miR-374b-5p, miR-143-3p, miR-26b-5p, miR-212-3p, miR-29c-3p, miR-26a-1-3p, miR-181a-5p, miR-363-3p, miR-29a-3p, miR-345-5p, miR-26a-5p, miR-27b-3p, miR-374a-5p, miR-362-5p, miR-324-3p, miR-550a-5p, miR-125a-3p, miR-106b-5p, miR-191-5p, miR-15b-3p , miR-222-3p, miR-139-5p, miR-92a-3p, miR-628-3p, miR-574-3p, miR-484, miR-127-3p, miR-146a-5p, miR-193a-5p, miR-342-3p, miR-7-1-3p, miR-134-5p, 409-3p). Em relação aos genes diferencialmente expressos, encontramos 1.069 genes e entre as vias relacionadas, quatro delas se destacaram por estarem relacionadas à LMC e à leucemogênese: MAPK, NRAS, KRAS e ROCK,

(2) pacientes com LMC tratados com transplante de medula óssea versus pacientes com LMC tratados com mesilato de imatinibe. Neste grupo encontramos 43 miRNAs diferencialmente expressos, sendo 1 com alta

expressão (miR-320b) e 42 com baixa expressão. Entre os miRNAs com baixa expressão, destacaram-se: miR-125a-3p, miR-485-3p, miR-409-3p e miR-574-3p. Os demais miRNAs (miR-20b, miR-502-3p, miR-127, miR-128a, miR-92a, miR-411, miR-532-3p, miR-140, miR-218, miR-125a-5p, miR-30c, miR-23a, miR-598, miR-362, miR-616, miR-331, miR-193a-5p, miR-454, miR-323-3p, miR-671-3p, let-7c, miR-30b, miR-532, miR-146a, miR-132, mmu-miR-491, miR-126, miR-708, miR-191, miR-543, miR-604, miR-548J, miR-550, miR-151-3p, miR-941, miR-1285, miR-378, miR-589) não são referidos na literatura relacionados à LMC, mas foram encontrados neste trabalho e merecem estudos adicionais por serem inéditos na literatura da LMC. Foram encontrados 1.117 genes diferencialmente expressos relacionados a estes miRNAs, sendo que o gene CRKL, alvo do miR-320b, é citado na literatura como relacionado à LMC, bem como as vias MAPK e NRAS, que também se destacaram entre os resultados de vias alvos dos genes de nosso estudo.

Este trabalho abre perspectivas do papel de novos microRNAs como biomarcadores da leucemia mieloide crônica. Pesquisas adicionais são necessárias para a validação dos resultados das análises *in silico* deste estudo.

ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética do Hospital Amaral Carvalho – Jau/SP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo funcional de microRNAs associados a leucemia mieloide crônica em pacientes tratados com TCPH ou mesilato de imatinibe

Pesquisador: Paula de Oliveira Montandon Hokama

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 93852218.6.0000.5434

Instituição Proponente: FUNDACAO DOUTOR AMARAL CARVALHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.917.389

Apresentação do Projeto:

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes que é causada por uma translocação entre os cromossomos 9 e 22 t(9;22)(q34;q11) que gera o cromossomo Philadelphia (Ph), formando o rearranjo gênico BCR/ABL. Apesar do sucesso da terapia com mesilato de imatinibe (IM), a persistência do gene BCR-ABL1 em pacientes que atingiram resposta citogenética e o desenvolvimento de resistência ao tratamento renovaram o interesse na fisiopatologia da LMC. Os microRNAs (MiRNAs) são moléculas de RNA fita simples de 19 a 25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do trabalho é identificar e relacionar por meio de bioinformática o perfil de expressão de microRNAs entre os seguintes grupos: pacientes com LMC – fase crônica versus pacientes tratados com transplante de medula óssea (TMO) e pacientes tratados com imatinibe versus pacientes tratados com TMO. Para esta finalidade, será utilizado o Ingenuity Pathway Analysis (IPA), ferramenta utilizada para o estudo de dados genômicos que fornecem dados sobre os efeitos biológicos dos miRNAs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de análise de material de estudos anteriores, sem riscos para os pacientes em questão.

Endereço: Rua das Palmeiras, 89
Bairro: VILA ASSIS CEP: 17.210-120
UF: SP Município: JAU
Telefone: (14)3602-1194 Fax: (14)3602-1207 E-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br



HOSPITAL AMARAL
CARVALHO / FUNDAÇÃO DR.
AMARAL CARVALHO



Continuação do Parecer: 2.917.389

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Possibilitar através da análise o desenvolvimento de novas drogas e identificação de fatores prognósticos para a LMC.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram adequadamente apresentados e foi executada a adequação sugerida no parecer anterior.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acompanha o parecer do relator.

Informamos que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar Relatórios Semestrais referentes à evolução do estudo e Relatório Final contendo os resultados da pesquisa.

Qualquer alteração/emenda o projeto deverá passar novamente por apreciação deste Comitê de Ética em Pesquisa.

Não autorizamos divulgação dos dados e/ou publicação sem antes passar para análise deste CEP o Relatório Final de encerramento do estudo contendo os resultados da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_987631.pdf	30/08/2018 16:03:31		Aceito
Outros	cv_paula.pdf	13/07/2018	GABRIEL ALMEIDA	Aceito

Endereço: Rua das Palmeiras, 89
Bairro: VILA ASSIS CEP: 17.210-120
UF: SP Município: JAU
Telefone: (14)3602-1194 Fax: (14)3602-1207 E-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br



**HOSPITAL AMARAL
CARVALHO / FUNDAÇÃO DR.
AMARAL CARVALHO**



Continuação do Parecer: 2.917.389

Outros	cv_paula.pdf	11:42:56	FERRACINI	Aceito
Outros	cv_juliana.pdf	13/07/2018 11:39:16	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Outros	cv_celia.pdf	13/07/2018 11:36:53	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Outros	termos_confidencialidade.pdf	13/07/2018 11:36:36	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Outros	termo_relatoriofinal.pdf	13/07/2018 11:36:28	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Outros	onus_financeiro.pdf	13/07/2018 11:36:10	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Outros	oficios_encaminhamento.pdf	13/07/2018 11:35:56	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Outros	autorizacao_dracristina.pdf	13/07/2018 11:35:45	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Outros	autorizacao_chefeservico.pdf	13/07/2018 11:35:35	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	isencao_tcle.pdf	13/07/2018 11:34:49	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	13/07/2018 11:33:54	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	13/07/2018 11:33:39	GABRIEL ALMEIDA FERRACINI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JAU, 25 de Setembro de 2018

Assinado por:
Osvaldo Contador Junior
(Coordenador(a))

Endereço: Rua das Palmeiras, 89

Bairro: VILA ASSIS

CEP: 17.210-120

UF: SP Município: JAU

Telefone: (14)3602-1194

Fax: (14)3602-1207

E-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br



Jahu, 29 de janeiro de 2016.
Ofício nº CEPFHAC – 02/16

A
Universidade Estadual Paulista – UNESP Botucatu

Prezados,

Informo que o Projeto de Pesquisa intitulado ***“MicroRNAs circulantes como novos marcadores prognóstico em Leucemia Mielóide Crônica”***, foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa conforme Parecer Consubstanciado de aprovação emitido pelo CEPFHAC 128/11 em 25 de novembro de 2011 tendo como Investigador Principal: Dra. Paula de Oliveira Montadon Hokama.

Em 20 de junho de 2014 o projeto de pesquisa foi ramificado em outros dois trabalhos intitulados: ***“Perfil Global de Expressão de MicroRNAs Circulantes como Marcadores de Tratamento em Pacientes Portadores de Leucemia Mielóide Crônica: Mensilato de Imatinibe e Transplante de Células Progenitoras Hematopoéticas”*** e ***“Estudo Funcional de microRNAs associados a Leucemia Mielóide Crônica”***, tendo como sub-investigadoras: Juliane Dias Dadalto e Leticia Antunes Muniz Ferreira.

Atenciosamente,


OSVALDO CONTADOR JUNIOR
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Fundação Hospital Amaral Carvalho

Rua Dr. Miranda Junior, 10, Jardim Alameda - CEP 17.210-300 - Jd. / SP - ☎ (014) 3602-1194 - Ramal - 1552

Parecer CEPFHAC - 128/11.

Projeto de Pesquisa:

"MicroRNAs Circulantes como Novos Marcadores Prognósticos em Leucemia Mielóide Crônica"

Documentos Analisados:

✓ Projeto de Pesquisa Completo.

Responsável pelo Estudo:

Dra. Paula de Oliveira Montandon Hokama - Médica onco-hematologista - Médica do Hospital Amaral Carvalho

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Amaral Carvalho analisou os documentos supracitados na 74ª reunião ordinária realizada no dia 25 de novembro de 2011. Segue abaixo as considerações feitas pelo relator:

"Em resumo, o presente projeto de pesquisa será realizado para maior entendimento dos mecanismos moleculares e genéticos que levam a resistência terapêutica e progressão da leucemia mielóide crônica (LMC). Tem como objetivo avaliar e comparar o perfil de micro-RNA entre os pacientes com LMC, em remissão citogenética completa tratados com inibidor de tirosinoquinase e os submetidos ao transplante de medula óssea alogênico há mais de um ano. Desta maneira, através do conhecimento do perfil de micro-RNAs dos pacientes que responderam ao tratamento, os pesquisadores tentarão encontrar diferenças ou semelhanças entre os pacientes tratados com inibidores de tirosinoquinase e os que foram submetidos ao transplante de medula óssea.

Trata-se de uma estudo quantitativo onde serão avaliados 48 pacientes com LMC em remissão citogenética completa e acompanhados no Hospital Amaral Carvalho de Jd., sendo 24 com mais de um ano de transplante de medula óssea alogênico e 24 em uso de tirosinoquinase. Serão utilizadas alicotas das amostras de sangue periférico dos participantes, as quais são coletadas rotineiramente para o monitoramento do bcr/abl (necessários para o tratamento), não havendo necessidade de novas coletas de sangue para o estudo.

O cronograma descreve o período execução completa do estudo. O TCLE contempla as exigências da resolução 196/96 da CONEP, redigido em linguagem clara e objetiva. Contém autorização do chefe do serviço e há declaração de que não envolverá ônus financeiro para a instituição.

Não havendo questões éticas envolvidas, sugiro aprovação deste projeto por este comitê de ética em pesquisa."

Diante do exposto, manifestamo-nos pela aprovação sem restrições dos documentos avaliados.

Informamos que os referidos documentos são rubricados pelo colaborador do CEPFHAC, Ricardo Augusto Sartori, e que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Jd., 25 de novembro de 2011.

Dr. Ederson Roberto de Mattos
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hospital Amaral Carvalho

ANEXO 2 - Genes expressos diferencialmente (alta expressão) no grupo de pacientes recém diagnosticados *versus* tratados com TCPH-alo

SEPT7	ATXN1	DCAF6	PCDHA10	GNAI3	USP37	SERTAD3	BTG2	PCDH11Y
MTSS1L	MAP2	ADIPOR2	PCDHA11	POGZ	GSG1L	TCF21	PLEKHA6	PDZD2
RASGRF1	PITPNA	ACBD3	PCDHA12	FOXN2	MECP2	PPP1R12C	MCOLN2	TTC9
ANK2	ELOVL5	ENSA	PCDHA13	NFATC2	SLC41A2	GDF11	S1PR1	KCNK10
PHF6	NRK	CDK13	PCDHAC1	VAPB	ZBTB4	SPRYD4	ANP32E	MOAP1
PIEZO1	PDE4D	EGR2	PCDHAC2	MAPK10	MATN1	CAMK2A	TGIF1	GOLGA8J
TMPO	FOS	CBL	RAP2A	NDST3	DNM3	GOLGA3	ARID1B	ACTC1
TPD52	WWC2	RAD23B	C18orf25	CREBZF	FOSB	LRCH1	ADCY3	
KPNA4	IRAK1	ELOVL1	SNCB	C11orf87	UBE2D2	ASPH	FOSL2	
PMP22	NSD1	CALU	TRPS1	RIMS3	CACNA1C	UBE2W	SOC35	
AP1S2	KDM2B	UBFD1	PIK3R1	NFATC3	PCDH17	CCNE2	CXCL5	
ATP2B2	ZNRF3	PRRT2	PANK3	OSTM1	LRP8	TFDP2	G3BP2	
UHMK1	TANC2	CALCR	PCMTD1	CLVS2	FAM192A	KBTD8	LINS4	
NME7	SLCO3A1	BASP1	TOX	IGF2BP2	TBX18	GID4	NPNT	
CTDSPL2	ZNFS32	NETO2	KCNQ3	SMARCA5	USP13	NUFIP2	AP1AR	
TSPAN3	NOVA1	TMTC3	CAMKK1	MYO10	MRFAP1	JOSD1	GRAMD1B	
IGF1R	CDS1	TNFRSF19	PHACTR4	VASH1	FUT8	LUZP1	DAB2IP	
TET3	SCN3B	IFFO2	VEZF1	DMRT3	MYLK	SLC9A7	TSC1	
PTPN4	TRAF6	CUL3	AGFG1	PHF2	NEXMIF	CDK16	IKZF2	
PDE4A	PTPA	NLN	TCF12	ZNF423	KANSL1	ATRX	MARCH4	
HMGCR	STX5	SLC30A5	DPP8	TMEM248	ZZZ3	PER2	FAR1	
PAPD4	METAP1	PCDHA1	TLE3	NR3C1	DENND2C	DENND4B	CHST1	
ARRDC3	SP1	PCDHA2	PPP3R1	YWHAZ	ZC3H12C	PPP1R37	PTPRJ	
KIF3A	WDR5B	PCDHA3	HECTD2	ZNF436	PDHX	AFF3	WWP2	
AEBP2	TMCC1	PCDHA4	ZFYVE16	RS1	GLRA1	PLEKHA1	COL19A1	
CSRNP2	CTNNB1	PCDHA5	SKP1	XKR7	LRRFIP2	TNPO1	CEP41	
DPYSL5	PRICKLE2	PCDHA6	PAIP2	KIF2A	MYLIP	MAN2A1	PCGF3	
SESN3	PAFAH1B1	PCDHA7	CD4	ETV6	PIK3R3	SLC38A2	GLYR1	
ETS1	RETEG3	PCDHA8	YOD1	HPCAL4	PTAR1	LMBR1L	DNAJC30	
APLP2	NR1D2	PCDHA9	AKAP5	GTDC1	PIK3CB	RGL1	PHTF2	

ANEXO 3- Genes expressos diferencialmente (baixa expressão) no grupo de pacientes recém diagnosticados *versus* tratados com TCPH-alo

TARBP2	TMEM12B	YOD1	COL4A6	SLC22A23	ARHGAP2	USP32	SMAD5	ARID4B	RASGEF1A	LYPD6	NSD2	SMTNL2	EBF2	ZBTB44	TRAM1	PHKA1	NFASC	PTPN3	ANKIB1	SPRY4	ZFP36L2
LOR	BRWD3	NRAS	C5orf51	FBXD21	DCBLD2	TANC2	PCDH41	MCF2L	SLC16A9	BMPT2	TADA2B	CRLF3	BCL6	COL5A2	JPH1	ATP7A	FERMT2	NCS1	FAM133B	NR3C1	CIADR
RNF20	IGF2BP1	FAM104A	MAP3K1	CIT	CAMTA2	EPH4	PCDH2A	NFAS3	ZNF101	CREB1	ITPR1L2	BCR	FGF1	PLEKHM3	ZHX1	PP3K/A6	COL24A1	TSC1	POK4	ATP2A2	BRWD1
TGFBFR3	CLASP2	ARHGAP2	ACER2	FLT1	GID4	KAT2B	PCDH3	CFL2	RAB22A	OSBPL5	DCUNID3	SHANK3	FGF9	PHF6	FAM81A1	FBXL20	RSBN1	CLSPN	CAP2A2	ZNF268	ETS1
SCN8A	PRRX1	GAUNT1	TMEM2	SLC6A3	GOSR1	BNP2	PCDH4	NIN	APBB2	NRIP3	MOSMO	UHFL4	SLC25A15	OTUD4	BTLA	PSME3	PRKAB2	ELL	ZBTB33	DNAJC13	COL16A1
CBX5	FASLG	SPATA2	KLHL28	LRCH1	AP2B1	PORA	PCDH45	GPRI37C	REST	IP07	NAPEPLD	PRRT3	PAG1	ALX4	TMCC1	GPATCH8	MTMR11	ACVR2A	FAM122B	SLC26A36	ZNF780B
RBMS2	ATP9B4	TMFRSS2	ARAF2	HTR2A	DIP2A	CSNK1G1	PCDH46	FNBP1L	EPHA5	PDE3B	CCDC7L	RBMS3	HHLA2	SELIL3	MRA5	RNF43	MAFK	KIF5C	FBXV7	MBNL1	EPC2
ZBTB39	MAP4K4	ZNF322	NR2C2	INTS6	ZNF74	FURIN	PCDH47	F3	PDLIM5	UEVLD	HBP1	CTDSP1	MAPK7	SLC4A7	PFML	PFMD	GNAI2	LRP2	GALNT7	ATXN7	AP1G1
HMG42	RALB	HMG41	SALL3	RAB1F1P1	MAPK1	SV2B	PCDH43	SIPR1	SESN3	SPTYD1	TMEM168	TMEM163A	TARDBP	COBLL1	IPK1	ATG3A	UBE2V1	TRIM66	STOX2	CPD	PRDM1
CPM	MBD2	SNX30	FAM45A	PKIX	E2F2	NFAS2	PCDH411	KPNA2	ZNF202	COL18A1	TBC1D8B	RAP2A	FAM168A	ACSL4	NCBP3	TUBA4A	YAPB	PHLPP2	SLC39A9	PHACTR4	BCLAF1
ZNF679	ZNF916	NR6A1	FGD4	CNGB3	LQLRAP1	PTPN4	PCDH42	SASH1	ZBTB9	OSTM1	HMG3B	CYTH1	MS2	SPTLC1	SLC8A4	IRAK2	SUMD3	IST1	AREL1	RNF169	XP07
SNX16	PLAGL2	PEX3	SSX2IP	ZFPM2	RPA2	ZADH2	PCDH43	C6orf120	FSDIL	GPR6	GAB1	RPRD1A	THR8	COL12A1	OMG	DENND4A	KCTD8	CBFA2T3	IRF2BPL	CNKS2	DNAJC21
GDF6	NOL4	SLC5A9	KIAA1622	SAMD12	LPRC55	LDLR	PCDH4C1	ETV1	GOLGA1	H53S75	MFAP3L	TIAM1	SECISBP2L	USP15	ZNRF3	CHD2	CLOCK	MYB	CDC37L1	PP3K/B1	PRLR
ANKRD46	CNJ	TSPAN18	FBXD31	SLC45A4	ATL3	ITCH	PCDH4C2	ITGB8	TALNA	TRPV6	RP38K/A5	ARHGEP12	RNMD5A	SLC41A2	PISD	MAMSTR	CNOT6L	AHCYL2	SH3GL2	NPTN	MAP3K3
RSP02	FNIP1	MDI1	PRAGD	DIRC2	CND1	HECTD2	CD69	ZBTB18	ZBTB8A	BNP1L	BTBD7	ZNF367	KIF3B	STK32A	MUP50	C2orf42	LAMTOR3	SLC7A2	IFPK	GFP1	ATXN3
CADM2	APBB3	DDX1B	CNK10	HEG1	PGM2L1	SH3PXD2A	DENND4B	ROCK2	MTF1	DPYSL2	SPRED1	MYCBP	KRA5	SLC38A1	KIF1B	LMAN2L	FGF2	ATP6V1B2	HMG2	BTBD3	ONECUT2
PITPNM3	TOR1AIP2	DDX1B	PEX5L	ZNF148	VNK3	POLR3G	ABL2	DPYSL5	FOXJ3	FZD3	INO80	PAPD5	FOSL2	VVC1	LUZP1	CONT2	DIXDC1	EIF5A2	SELENOI	RALGAPB	SOX6
GAS7	RGS16	ABCC5	DA2AP2	ARMC8	EDA2R	MCC	FAM128A	MAPRE3	CMPK1	PHC3	SYOP	NFAT5	PKICE	HECTD4	PPP6R3	ZCCHC2	BACE1	TBLX1R1	JAZF1	PRDX1	DYNCL12
SMCR8	SOX13	LPH	RAB9B	PXYLP1	STAT3	PRR16	IP09	NRP1	LRR9	FNDC3B	BBX	KLHDC10	RASGEF1B	BCL7A	CLCN5	PLEKHA1	PIM1	DCUNID1	VIF1	IP05	KITLG
RAB1F1P4	PPP1R15B	IGF2BP2	ARHGAP26	PLSCR4	HLF	NEUROG1	FBXO28	VAC	CC2D1A	ILIRAP	XPN1	KIAA1543	CREBZF	AKAP11	AMER1	CACNA1E	EPB41L4B	CLDN12	CPSF6	PDI4A6	UNC5D

PHKA1	NFASC	PTPN3	ANKIB1	SPRY4	ZFP36L2	ERLIN2	VPS37B	ANXA7	OSBPL8	CBLL1	ABHD2	BLOC1S2	GOSR2
ATP7A	FERMT2	NCS1	FAM133B	NR3C1	CIADR	NSMAF	KPNA3	SERINC3	LSM11	FOXP2	C2orf124	CIPC	MBTD1
PP3K/A6	COL24A1	TSC1	POK4	ATP2A2	BRWD1	MYBL1	SYBU	PMEPA1	PXN	AMOT	HAPLN1	VLDLR	TLK2
FBXL20	RSBN1	CLSPN	CAP2A2	ZNF268	ETS1	TIMP3	ZPLD1	ITSN1	MED9	RTF1	ZNF608	PTPRD	SHE
PSME3	PRKAB2	ELL	ZBTB33	DNAJC13	COL16A1	TBL1X	ZNF445	TXK	KCNJ12	RF3X	PFKFB2	EPB41L1	SUCO
GPATCH8	MTMR11	ACVR2A	FAM122B	SLC25A36	ZNF780B	USP9X	TAOK1	KIAA1211	MAP3K3	NKPE3	RTN1	CNOT7	NEDD4
RNF43	MAFK	KIF5C	FBXV7	MBNL1	EPC2	CHIC1	SUZ12	MOB1B	SETD5	RAP2C	H0XA9	NIPAL4	NEO1
PFMD	GNAI2	LRP2	GALNT7	ATXN7	AP1G1	RCN2	RUNK3	DDX6	MEF2A	YTHDF3	A1CF	IRF4	GOLGA6C
ATG3A	UBE2V1	TRIM66	STOX2	CPD	PRDM1	CLASP1	ATP2B2	TOR1B	LZTS3	GRB10	KPNA6	FOXO1	BCL3
TUBA4A	YAPB	PHLPP2	SLC39A9	PHACTR4	BCLAF1	TGIF2	ABHD17C	TRAK2	SLC23A2	THAP2	NABP1	PLAG1	FOSB
IRAK2	SUMD3	IST1	AREL1	RNF169	XP07	LOX	TET3	USP37	PAIP2	METAP2	ADM	ARFGEF1	PPIF
DENND4A	KCTD8	CBFA2T3	IRF2BPL	CNKS2	DNAJC21	CREBL2	CACUL1	MPPED2	HBEGF	MED13L	PTP4A1	UBE2W	PAPSS2
CHD2	CLOCK	MYB	CDC37L1	RPS6KB1	PRLR	GATA6	KCNJ2	ZDHHC7	ETNK1	CDK8	CCDC28A	ZFH4	PANK1
MAMSTR	CNOT6L	AHCYL2	SH3GL2	NPTN	MAP3K3	TULP4	MTCL1	ETV5	KCNK2	SULF1	GSR	PAQR9	CPEB3
C2orf42	LAMTOR3	SLC7A2	IFPK	GFP1	ATXN3	PKNOX2	QKI	IMPDH1	PNN	CD200	LETM1	HORMAD2	LCOR
LMAN2L	FGF2	ATP6V1B2	HMG2	BTBD3	ONECUT2	GSE1	RP56KA2	HPRT1	DAAM1	FRMD4B	CPPED1	TXN2	VBP1L
CCNT2	DIXDC1	EIF5A2	SELENOI	RALGAPB	SOX6	ELMSAN1	PHF4	FMRI	SMAD2	YPEL1	ZSVIM6	ATXN10	GPAM
ZCCHC2	BACE1	TBLX1R1	JAZF1	PROX1	DYNCL12	AJAP1	CCDC126	SLC6A8	NFATC2	CAS21	ELAVL2	SNX12	IKZF5
PLEKHA1	PIM1	DCUNID1	VIF1	IP05	KITLG	AMMECRIL	MEMO1	GTF2A1	KLF7	ZNF652	PRKCD	VIPF2	MAN2A1
CACNA1E	EPB41L4B	CLDN12	CPSF6	PDI4A6	UNC5D	RAB21	ATL2	GSKIP	CALU	MAPK6	MAT2A	RETREG3	JADE2

ANEXO 4 - Genes expressos diferencialmente (alta expressão) no grupo de pacientes tratados com TCPH-alo *versus* tratados com mesilato de imatinibe.

TSC1	RELT	PRPS1	TIPARP	SREK1	SLC10A7	CPD
CKAP5	EMILIN2	FOXM1	SLC6A8	PIK3R1	ARFIP1	DAZAP1
GTPBP2	MYL12A	DNAJA2	ST3GAL1	SDK1	THUMPD3	FKBP5
SASH1	ONECUT2	CYLD	ZDHHC21	ELMSAN1	RBMS3	AGPS
UMAD1	CDH20	RAP1A	MLLT3	ZDHHC3	ACVR2B	FAM199X
SCAI	RAD51	GOLGA3	CRKL	DAG1	STARD4	KCNAB1
TMEM2	MYEF2	PAN3	MAPK1	MAK16	VDAC1	MIER3
SLC28A3	RAPGEFL1	IRF6	CACNG2	ZBTB10	PCDHA1	ELOVL6
PLPPR1	WNT9B	FBXO28	KIN	MTDH	PCDHA4	TLL2
PALM2	ZNF652	B3GALNT2	MINDY3	USP46	PCDHA5	TFCP2L1
FLRT3	FBXO42	SNTB2	PLXDC2	SEC63	PCDHA6	YIPF6
NKX2-4	NECAP2	KLHL36	COMMD3-BMI1	HECA	PCDHA8	CALN1
PPP1R16B	TUSC3	MAP1LC3B	RAB18	DHDDS	PCDHA9	ANKH
PPP2R2C	EGR3	GRASP	NFIA	KITLG	PCDHA10	CISD2
NRN1	ENTPD4	PPM1H	AK4	VPS37B	PCSK6	IDE
RBM24	TANC2	PTPRB	MIER1	GMCL1	MAPK8IP3	
NABP1	SMARCD2	ABHD13	DENND5B	KDM7A	ATF7IP2	
AGFG1	SYNGR2	CFL2	PFKM	NAA40	MITF	

ANEXO 5 - Genes expressos diferencialmente (baixa expressão) no grupo de pacientes tratados com TCPH-alo *versus* tratados com mesilato de imatinibe

ZNF304	OSER1	ZBTB20	ZMYM4	ZNFX1	SLC24A4	BRCC3	BNC2	DNMT3A	GRIK3	CSDE1	PLXNA4	TRAF3	GAS2L3
MTMR3	RIPOR2	POGLUT1	MTRNR2L1	TMEM50B	ABHD5	SYNGR1	CELF2	SLC35B4	B4GALT2	KLF12	TEAD1	UBE2J	EFR3B
ITGA8	NRP2	BICC1	CSGALNACT1	SLC5A3	HOOK3	GRAMD4	JCAD	UGT8	RIC8B	ESRRG	HSPA9	OTUD3	KCNK3
OSBPL9	CREB1	PPIF	SCAMP2	C2CD2	PDGFRA	CASK	NFIA	TMEM86A	TPCN1	RNF144A	IDE	LUZP1	YIPF4
MLF2	STK39	FXR2	PTPN4	CYP26B1	CNOT6L	EPHA7	PDE4B	PIRT	ARHGEF37	TFDP2	CPD	MTMR9	SERTAD2
ETV6	SS18	SOX5	SAMD12	DUSP2	WDFY3	NAV3	MIGA1	JDP2	TSPAN18	ELAVL2	ANKRD13C	RNF157	CEP41
ANKRD33B	DCC	PAIP2	RG54	MFSO9	PKD2	RTN3	SLC38A1	MAP4K4	KSR1	HMGCS1	CTDSPL	TAF1	CREB3L2
GDNF	GREM1	LZTS3	ANO6	BCL2L11	PDJIM5	GABRB2	GPBP1	PPP1R9A	MAP2K7	UCHL5	PCDHA1	ATRX	ELOVL6
SNX18	UBR1	SLC23A2	GAB1	CYB561D1	GRP63	LYSMD3	SREK1IP1	ZFAND5	USP15	PHOX28	PCDHAC1	USP28	DCLK2
SLC38A9	MSL1	GDF5	ERI1	PTGFRN	OSTM1	TJP1	ENC1	STIM2	PIK3CB	ADAMTS3	PCDHAC2	GRAMD18	SH3D19
UCK2	WIPF2	GAPVD1	CSRNP3	FAM46C	HS3ST5	MYNN	LHFP2	PAX3	LUC7L3	KIAA0408	TBC1D1	SRPRA	PPARGC1B
ABL2	ALDH4A1	NACC2	NR4A3	ACTR1A	L3MBTL3	IL6R	ARSB	TRIP12	ADCYAP1R1	UBE2H	TMEM237	C21orf91	CAMK2A
QKI	SPG21	VAPA	RASSF2	SHOC2	ESR1	USP24	DNM3	R3HDM1	DENND6A	KDM7A	IKZF3	AFF3	RNF141
LFNG	MBTD1	MEIS2	KIF3B	FAM45A	ZBTB8A	PKIA	PPM1A	CLCF1	OLIG3	OTUD4	RAB11A	KCNK4	EIF4G2
ZFYVE1	YPEL2	ANP32A	ITCH	ZRANB1	MTF1	GAP43	ENTPD5	MFHAS1	CDKS1R1	GRIA1	RBM26	ANP32E	CHST1
ELMSAN1	DCAF7	MAP3K3	MMP24	TMEM132B	UBXN2A	SNX30	SETD2	TEX2	PALM2	LIN7C	ATP11A	SEC31B	ARRDC3
AREL1	SLC9A7	KDM5A	TTPAL	AMER2	DNAJC27	SPIN1	CHD7	TRO	CCND2	RAB3B	NFTXR	CCDC186	MAN2A1
DOCK3	CADM1	NFATC2	IL1RAP	FLT1	DPSYLS	ATRN	RCHY1	COL9A3	PLPP3	PDETA	NIPBL	PLEKHA1	SLX4
DUSP7	ZKSCAN2	BRWD1	FGF12	DGKH	MAPRE3	ISM1	UBE2D3	CELF3	LRP6	EFNA5	ERLIN2	PITPNM2	GLYR1
BAG4	N4BP1	RAB6B	KLF3	FNDC3A	COX7A2L	TOP1	PTPA42	ADAM12	YTHDF3	ZNF592	ING5	LRCH1	SNN
IMPAD1	RPGRIPL	RAP28	SMIM14	ITPK8	FBXO48	SYS1	TMCC3	CEP170	UBE2N	PRR3	ACVR2B	AXL	SPOCK2
SLC4A4	RGPD4	FXR1	LHX6	MYT1L	DNAJB9	CPEB2	PLEKHH2	SEMA3A	GPR85	NABP1	PCSK1	PPP1R37	DNAJB12
RP56KA1	GCC2	PHF20L1	PPP6C	ROCK2	TMEM168	PPARGC1A	UBN2	B3GNT5	SAMD8	DES	DCP2	CD42BPA	CCSER2
RIMKLA	RGPD6	KCNN3	MYLIP	C16orf70	MKLN1	KIAA1958	RBM27	SBF1	TAF4B	CTIF	GID4	ZBTB18	PIPSK1C
ZNF691	BRSK2	ETNK1	ATXN1	NFAT5	TSH23	PRPF4B	ADAM19	NHS	ACBD3	CSF3	DKK3	GRHL1	SCUBE3
MSI1	SMAD9	ARID2	FAM126B	FMFR2	LRRCS5	TMEM170B	CHL1	ZNF264	PAPD4	CBX1	ALMIGO1	PHLPP2	CD2AP
CGREF1	NPAS3	BTD07	BMPR2	ATXN1L	CYP2U1	ERBB4	SRGAP3	PIP4K2A	TGFBRA1	PRDM16	NNAT	ZFH33	TRAM2
TTCTA	FAM133B	AMD1	RETBG2	KIAA0513	ARHGAP26	OLA1	EOMES	EVIS	INO80	HNRNPR	ALG9	RASSF3	PHF3
KIAA1841	ZHX1	SPAST	MAP3K2	PITPNA	CREBRF	FUT4	AZ12	SAMD4A	CLCN6	NPTN	MOSMO	DYRK2	
PODXL	TRMT2A	ATL3	LYPD6	FMNL3	FGD5	NOL4	ROBO2	FBXO34	DPYSL2	CLMP	KPNA4	STRN3	
ELL	NRARP	AFF4	RND3	RAB5B	NR2C2	RCOB1	LSAMP	ASCC3	F3	PAPD5	SPRY3	STYX	
DTX4	NEBL	PRICKLE2	SCN1A	IKZF4	WEE1	SEMA6D	EIF4EBP2	GIGYF1	SNX27	PIP5K1A	MRPS35	SMURF1	
SYVN1	COMMD3-BMI1	SLC25A28	CERS6	ERBB3	HP55	ATXN7L3	GHTM	RAPGEF2	PAN3	TRIM13	RBBP5	TMEM255A	
STOX2	ARHGAP21	ZNF516	CYBRD1	ANKRD52	CRY2	TARDBP	IKZF2	STAC	PROX1	CALM3	TMEM260	MBNL3	
NIPAL4	ADCY6	TJAP1	SLC40A1	GPRI37C	IRF1	EPHB2	BRWD3	NRG3	MAF	HAS3	FOXJ3	PCDH11Y	
CCNL	OTULIN	ZNF367	KDM2A	PON2	SAR1B	PSD3	A1CF	LCOR	TBL1XR1	EIF4B	ADGRL1	DES1I	
ZFP62	POU2F1	PPP1R11	PGM2L1	SERP1	SMAD5	CLK3	MACF	RAB3D	MECP2	PEG10	RNF150	DENND4B	
GPC1	XPR1	ZNRF3	NPAT	PHC3	RGMA	SLC16A6	KCNJ12	UHRF1BP1	RAI2	PPM1L	GLP2R	NF2	
EDEM1	COLGALT2	ZNRF2	EXPH5	XIAP	C16orf72	CHST7	CARF	FOXPA	CC2D1B	TMEM164	NOL4L	PLXDC2	
NUP210	MPP6	CDS1	ZC3H12C	HMGGB3	FRMD4B	HDX	GZF1	SEC23B	RP56KA5	SREBF2	CPEB4	GPR15B	
ANPEP	DDHD1	KDM2B	YES1	KLHL15	C3orf38	GPRC5B	EED	NEK6	UBE2W	KPNA6	MAP2K4	PIK3R3	
ATXN7	PELJ2	WWC2	SLC39A6	ST3GAL1	FOLQ	VAPB	ZNF521	ST7L	CRISPLD1	ATP2B1	NEDD4L	ERGIC2	
RYBP	PLEKHH1	PSME3	DOK6	SLC45A4	HEG1	ADAMTS5	ACTC1	RAP1GAP2	HECA	UBE2E1	SLC30A7	RAB3C	
ABTB1	SFRP1	CYLD	SOC36	PTPRD	IPMK	SOWAHC	FBXL20	FMR1	IGF1	TRIM71	LIN54	AGGF1	
REEP3	ZNF704	ATP2A2	ZADH2	KCNJ10	VPS26A	SH3PXO2A	CBX2	FAM126A	SOC55	CARHSP1	SHOX	BTG2	
TYSND1	BMP3	NAPEPLD	GNB5	TBC1D17	RABEP1	CASP7	CHD9	RIMS4	MDFC	PALD1	GNAQ	ARID1B	
DHX33	FUT9	C6orf106	ORMDL3	DIP2A	GOSR1	HS6ST3	STRIP1	KCNE4	JADE1	DUSP13	SYNDIG1	FAM20C	
SARM1	RIMS3	TMC7	PLEKHM1	MAPK1	RAB11FIP4	ZNF793	CTTNBP2NL	ARRB1	SETD7	CHD3	JPH2	SNX13	
DIRAS1	MED13L	ZCCHC14	DNAJC16	KIAA1671	LDLR	TMEM170A	RIMBP2	NKIRAS2	PTPRG	NDP	LPP	ATG14	
TMED1	SOS1	CDK6	ELOA	SSX2IP	VEGFA	MIA2	PCDH17	ZNF609	CCDC6	C11orf87	RG53	FOXN3	
BAK1	NRXN1	CUL3	UBE3C	CD69	ENPP5	GNG2	MCF2L	ATOH8	TRERF1	MINDY2	DAB2IP	ATXN3	
LRFN2	NCAN	ACVR1	ARHGEF10	FGD4	MCM3	YWHAG	FRMD6	KDELRL1	FBXO9	NFATC2IP	TSC1	PCMTD1	
SRF	CLP1	CEP57	PPP1R3B	PIK3R1	MBNL1	TECPR1	DCX	RARG	B4GALT5	FRS2	COL5A1	SGK3	
ZC3H4	CISD2	C18orf25	ENTPD4	IPO9	RPP25	SLC25A36	CPNE8	HOXC4	LDHA	ADAM22	MARCH4	MMF16	
RAB11FIP1	VEGFC	BMF	BNIP2	DSTYK	KLF8	CAPN6	SLC6A3	BCL2L2-PABPN1	RPRD18	TTCL14	EPC2	CNME2	
SPTY2D1	UBE2F	IFFO2	FAM219B	RP56KA2	RLIM	TENM1	ILDR2	PABPN1	SMIM13	MPP7	MAP3K20	NIPAL1	
PDEBB	THR8	KMT2A	CHIC1	ETV1	KIRREL3	TNRC6B	CEP350	CSNK2A1	USP37	GBP1	ITGAV	CXCL5	
MYOCD	HAPLN1	ITSN1	PRDM10	MAP3K9	FGFR2	TXLNG	MTDH	CPSF2	ARIH1	KRAS	TPBGL	G3BP2	
ABCA1	PDPK1	IGF2	RBL2	DNAL1	PEX5L	HAS2	KIAA1522	MYRIP	SCN2B	IL6ST	LDLRAD4	TCF21	
C20orf194	NAA50	SLC7A1	NCOA3	CEP128	MTMR1	WISP1	ZDHHC17	RPP14	TET3	ZKSCAN1	TECPR2	LIN28A	