UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FELIPE MAGALHÃES FURTADO

**Avaliação da expressão de miRNAs e comprimento
telomérico em linfocitose B monoclonal e leucemia
linfocítica crônica**

Ribeirão Preto

2015

FELIPE MAGALHÃES FURTADO

**Avaliação da expressão de miRNAs e comprimento
telomérico em linfocitose B monoclonal e leucemia
linfocítica crônica**

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto para obtenção do título de Doutor
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Passetto
Falcão

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

FURTADO, FELIPE MAGALHÃES

Avaliação da expressão de miRNAs e comprimento telomérico em linfocitose B monoclonal e leucemia linfocítica crônica – Ribeirão Preto, 2015.

88p. 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Passetto Falcão.

1. Linfocitose B Monoclonal, 2. Leucemia Linfocítica Crônica, 3. microRNA, 4. telômeros.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Magalhães Furtado

Avaliação da expressão de miRNAs e comprimento telomérico em Linfocitose B
Monoclonal e Leucemia Linfocítica Crônica

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha mãe pelo amor e apoio incondicional
em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos voluntários desta pesquisa, pelos ensinamentos, colaboração e paciência.

Ao Prof. Dr. Roberto Passetto Falcão por proporcionar-me a honra de ser seu aluno.

A todos os meus professores do ensino básico à pós-graduação por contribuírem na minha formação.

À Professora Silva Magalhães, que sempre me ajudou e apoiou independente da distância.

À direção e aos funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo apoio para atendimento dos voluntários.

À Amélia G. Araújo, pela assistência técnica nos experimentos de PCR.

À Aglair Bérghamo Garcia, Denise Aparecida Palma e Dra. Priscila S. Scheucer, pela assistência técnica e científica com citometria de fluxo.

À Dra. Dalila S. Zanette e ao Dr. Hamilton Gimenes, pelo valioso apoio técnico com os experimentos com miRNAs.

Ao Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues e à Dra. Bárbara Santana, pelo valioso apoio com os experimentos com telômeros.

À Natália Scatena, por ter compartilhado os dados do seu mestrado para que fossem usados como controles.

Ao Dr. Daniel Mazza Matos, pelo apoio com os dados de Linfocitose B Monoclonal.

Aos meus amigos(as) do laboratório, por terem ajudado a tornar o trabalho menos monótono e pelas dicas inteligentes sempre que necessário.

Aos meus amigos Wallace, Rafael Monge, Ticiano e Ulisses, por terem sido minha primeira família longe de casa.

Ao Manuelito, por ter sempre me incentivado a estudar e seguir o caminho da ciência.

Ao meu pai e meus irmãos, pelo apoio sempre que necessário.

Aos meus avós Paulo e Ondina por terem sempre incentivado seus filhos e netos a terem o estudo que não tiveram oportunidade de ter.

Aos meu avô Furtado pelo seu exemplo e amor à medicina e avó Zilda, sua companheira em todos os momentos.

À minha esposa, Paula, por todo o amor, carinho, paciência, dedicação e apoio necessários para a conclusão deste desafio e a seus parentes, por terem se tornado minha família distante de casa.

A Deus, por ter sempre me proporcionado ótimas oportunidades.

RESUMO

Furtado FM. Avaliação da expressão de miRNAs e comprimento telomérico em linfocitose B monoclonal e leucemia linfocítica crônica [tese]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2015.

Leucemia Linfóide Crônica (LLC) é a leucemia mais comum em países ocidentais, tem apresentação clínica e evolução heterogênea. Especula-se que todos os casos sejam precedidos por Linfocitose B Monoclonal (LBM). Não são bem conhecidos os mecanismos moleculares responsáveis por esta evolução. Alterações na expressão de miRNAs e em comprimento telomérico podem contribuir para desencadear esta neoplasia. O objetivo deste estudo foi identificar diferenças em comprimento telomérico e expressão de miRNAs entre pacientes com LLC, portadores de LBM clínica e populacional e controles saudáveis. Estudamos 21 pacientes com LLC, 11 portadores de LBM clínica, 6 de LBM populacional e 10 voluntários saudáveis. Para o controle de comprimento telomérico, utilizamos dados de estudo anterior do nosso serviço com grupo de 261 voluntários saudáveis de 0 a 86 anos. Realizamos separação de células CD19+CD5+ por citometria de fluxo nos grupos de estudo e de linfócitos B no grupo controle. Analisamos expressão dos miRNAs 15a, 16-1, 29b, 34a, 155, 181a e 181b por RT-qPCR e comprimento telomérico por qPCR. O miR-155 foi o único que demonstrou expressão diferente entre os grupos LLC e LBM, sendo maior nos pacientes com LLC. Este miRNA e o miR-34a têm aumento de expressão nas células com fenótipo anormal, apesar desta diferença não ter tido significância estatística quando considerada a expressão do miR-155 na LBM. Os miRNAs 15a, 16-1, 181a e 181b são hipoexpressos nas células com fenótipo anormal. O miR-29b teve expressão semelhante nos grupos estudados. O comprimento telomérico foi semelhante nos 3 grupos de estudo e menor quando comparados ao grupo controle. O miR-155 tem diferente expressão em LBM e LLC, podendo ser um dos responsáveis por esta evolução. Alterações nos miRNAs 34a, 15a, 16-1, 181a e 181b contribuem para expansão clonal de linfócitos B CD5+. O papel do miR-29b na fisiopatogênese e evolução da LLC ainda não está bem definido. O comprimento telomérico diminuído em LLC e LBM pode fazer parte dos eventos iniciais da fisiopatogênese desta leucemia.

Palavras-Chave: Linfocitose B Monoclonal, Leucemia Linfocítica Crônica, microRNA, telômeros.

ABSTRACT

Furtado FM. microRNA expression and telome length analysis in monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia [thesis]. Ribeirão Preto (SP): University of São Paulo, Faculty of Medicine; 2015.

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most common leukemia on Western countries, it has an heterogeneous clinical presentation and outcome. Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) may precede all CLL cases. The molecular mechanisms responsible for this evolution are not known. Aberrant miRNA expression and telomere shortening may contribute for the pathophysiology of this disease. The objective of this study was to identify differences on telomere length and miRNA expression between CLL patients, subjects with clinical and population-screening MBL and healthy volunteers. 21 CLL patients, 11 subjects with clinical MBL, 6 with population-screening MBL and 10 healthy volunteers were enrolled on this study. As control for telomere length, we used a group of 261 healthy volunteers aged 0 to 86 years old that had been enrolled on a previous study from our group. After diagnosis confirmation, it has been done a flow citometry CD19+CD5+ cell sorting for the study groups and CD19+ cell sorting for the control group. The expression of the miRNAs 15a, 16-1, 29b, 34a, 155, 181a and 181b was determined by RT-qPCR. The telomere length was determined by qPCR. miR-155 was the only one with different expression between the CLL and MBL groups, presenting higher expression on the CLL group. This miRNA and the miR-34a are overexpressed on the study groups when compared to the control group, although this difference did not reach statistical significance when the miR-155 expression in MBL is considered. miRNAs 15a, 16-1, 181a and 181b are underexpressed on the study groups. The miR-29b was the only one with similar expression on all groups. The telomere length was similar on the 3 study groups and shorter on these groups when compared to normal subjects. The expression of miR-155 is different in CLL and MBL, it may contribute for this evolution. Aberrant expression of miR 34a, 15a, 16-1, 181a and 181b may contribute for the clonal expansion of CD5+ B lymphocytes. The role of miR-29b on the CLL pathogenesis and evolution is still not understood. The reduced telomere length on CLL and MBL may be part of the initial events of this leukemia pathogenesis.

Key-Words: Monoclonal B-Cell Lymphocytosis, Chronic Lymphocytic Leukemia, microRNA, telomeres.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Leucemia linfocítica crônica e linfocitose B monoclonal	10
1.2 miRNAs definição e função	12
1.3 miR-15a e miR-16-1	15
1.4 miR-29b.....	16
1.5 miR-34a.....	17
1.6 miR-155.....	18
1.7 miR-181a e miR-181b	19
1.8 miRNAs na patogênese da LLC	19
1.9 Telômeros	20
 2 JUSTIFICATIVA.....	 22
 3 OBJETIVOS.....	 23
 4 MATERIAL E MÉTODO.....	 24
4.1 Grupos de voluntários	24
4.2 Citometria de fluxo	24
4.3 Purificação de linfócitos B	28
4.4 Extração de RNA e RT-qPCR para expressão de miRNA	29
4.5 Extração de DNA e qPCR para comprimento telomérico	31
4.6 Análise estatística	32
 5 RESULTADOS.....	 34
5.1 Características clínicas:.....	34
5.2 Expressão de miRNAs	35
5.3 Comprimento telomérico	40
 6 DISCUSSÃO	 43
6.1 miR-155.....	43
6.2 miR-34a.....	44
6.3 miR-15a e miR-16-1	45

6.4 miR-181a e miR-181b	46
6.5 miR-29b.....	47
6.6 Telômeros	48
7 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS	67
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	67
ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa local	71
ANEXO C – Artigo científico.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia linfocítica crônica e linfocitose B monoclonal

Leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma doença linfoproliferativa B crônica caracterizada pela proliferação e acúmulo de linfócitos B monoclonais em sangue periférico, medula óssea, baço e linfonodos¹. Segundo o Workshop Internacional em LLC, esta neoplasia é definida pela presença em sangue periférico de mais que $5,0 \times 10^9/L$ linfócitos B monoclonais de imunofenótipo característico ou pela existência de citopenias induzidas por infiltração da medula óssea².

LLC é a leucemia mais comum em países ocidentais, com incidência anual de 5,1 casos por 100.000 habitantes. Tem prevalência maior em homens e sua incidência aumenta com a idade, sendo 70 anos a idade média ao diagnóstico³.

Essa leucemia tem apresentação heterogênea. A maioria dos pacientes são assintomáticos e recebem o diagnóstico após investigação pelo achado de linfocitose. Os pacientes sintomáticos geralmente apresentam adenomegalias e sintomas relacionados a anemia⁴. A evolução pode ser desde insidiosa sem necessidade de tratamento, até aqueles com doença agressiva e refratária à poliquimioterapia.

O imunofenótipo celular CD19+, CD5+, CD23+, com expressão baixa ou ausente de CD20, FMC7 e imunoglobulina de superfície é característico da LLC^{5;6}. Nos últimos anos, com o uso de análises modernas por citometria de fluxo, foram identificados indivíduos com populações monoclonais de células B fenotipicamente muito similares à LLC, mas que não preenchem critérios diagnóstico para esta patologia. Este achado ocorre no sangue periférico de aproximadamente 0,6 a 12% da população geral^{7;8;9} e foi denominado Linfocitose B Monoclonal (LBM)⁶.

LBM é uma condição assintomática caracterizada pela expansão em sangue periférico, persistente por pelo menos 3 meses, de linfócitos B monoclonais (menos que $5,0 \times 10^9/L$) em pessoas sem sinais ou sintomas de doenças linfoproliferativas, infecções ou doenças auto-imunes^{9;10}.

A LBM é subdividida em 2 grupos, LBM clínica e LBM populacional. A primeira é caracterizada pela contagem de células B circulantes monoclonais entre

500 e 5.000 por microlitro e, na maior parte das vezes, é detectada ao acaso pela identificação de discreta linfocitose em hemograma de rotina. A segunda é observada em pessoas saudáveis, sem aumento da contagem absoluta de linfócitos, que realizam testes de rastreio por citometria de fluxo ^{10; 11; 12}.

Virtualmente todos os casos de LLC são precedidos pela LBM, independente da agressividade da doença ¹³. Assim como essa leucemia, a LBM é mais frequente em homens, aumenta a frequência com a idade ^{7; 14; 15; 16; 17; 18} e tem incidência relativamente mais alta em familiares de pacientes com LLC ^{15; 19; 20}.

Há evidências que LBM clínica e populacional apresentam as mesmas alterações citogenéticas e estado de mutação IGHV normalmente encontrados em LLC de baixo risco ^{9; 18}. Na LBM populacional, as alterações citogenéticas são encontradas mesmo quando o número de células semelhantes às da LLC é extremamente baixo e estes indivíduos não apresentam nenhum sinal de progressão ¹².

A LBM clínica pode evoluir com quadros clínicos distintos: progressão para LLC, outra doença linfoproliferativa ou outra enfermidade; persistência de LBM sem progressão; resolução gradual da LBM conjuntamente com outras manifestações de senescência imune; ou regressão da LBM sem evidência aparente de declínio na resposta imune ²¹.

O risco de progressão de LBM clínica para LLC varia de 1,1 a 10% ao ano ^{8; 9; 17; 22}. O único fator capaz de prever esta progressão é a contagem de linfócitos monoclonais ao diagnóstico ²². A incidência de LBM é pelo menos 100 vezes maior que a de LLC, portanto não se pode garantir que a aparição da monoclonalidade per si seja um sinal de transformação neoplásica ^{5; 23}. A LBM populacional tende a manter-se estável e raramente é associada a linfocitose progressiva ou desenvolvimento de LLC ^{9; 10}.

Na LBM clínica, o risco de hospitalização por infecção é semelhante ao da LLC em estágio inicial, mas difere desta neoplasia pelo fato de que as células B anormais tendem a manter-se estáveis ao longo do tempo e há menor risco de necessidade de tratamento por doença progressiva ¹⁰.

Tabela 1. Diferenciação clínica e laboratorial entre LBM clínica e LBM populacional.

	LBM clínica	LBM populacional
Contagem absoluta de linfócitos	Aumentada	Normal
Células B neoplásicas	Usualmente $\geq 1500 / \mu\text{L}$	Usualmente $\leq 50 / \mu\text{L}$
Comprometimento clínico	Maior risco de infecções graves	Normalmente assintomáticos
Risco de progressão para LLC	1,1 a 10% ao ano	Semelhante ao da população geral

Os mecanismos genéticos que levam ao desenvolvimento da LLC permanecem obscuros, já que nenhuma alteração genética foi demonstrada como iniciadora se sua patogênese. Especula-se que a lesão genética inicial ocorra na célula B imatura da medula óssea. Estimulações antigênicas repetitivas posteriores provavelmente levam a lesões genéticas adicionais que resultam em transformação neoplásica ²⁴.

Atualmente não há evidências de que o diagnóstico precoce da LLC traga algum benefício ao paciente. No entanto, o diagnóstico de LLC em seus estágios iniciais pode ter valor para a identificação e definição dos mecanismos responsáveis pela etiologia e progressão da doença ⁶.

1.2 miRNAs definição e função

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs fita única de 19 a 25 nucleotídeos que constituem uma nova classe de mecanismos reguladores da expressão gênica ²⁵. Eles ligam-se a RNAs mensageiros (mRNA) alvo e promovem sua degradação e/ou inibem sua transcrição ^{26; 27}. Os níveis celulares de miRNAs são precisamente controlados para assegurar o funcionamento e diferenciação celular adequados ²⁸; expressões aberrantes destes RNAs são comumente observadas em processos patológicos, incluindo oncogênese ²⁵.

Muitos miRNAs têm suas sequências e funções conservadas em diferentes organismos distantemente relacionados ²⁹, sugerindo que esta classe de pequenos RNAs seja parte integral de processos celulares essenciais. Sua forte conservação evolutiva indica que têm origem antiga ³⁰, apesar de terem sido identificados apenas recentemente. O seu descobrimento abriu uma nova dimensão na compreensão da regulação gênica ³¹.

Os genes de miRNAs são transcritos de sítios inicializadores de transcrição pela RNA polimerase II para a formação de transcritos primários (pri-miRNAs) ³². Estes são geralmente de fita única com 3 a 4 quilobases, possuem estrutura secundária complexa, são poliadenilados e protegidos com metilguanossina ³³. A enzima nuclear RNase III Drosha e seu cofator DGCR8 (*Digeorge syndrome critical region gene 8*) processam os pri-miRNAs em um ou mais precursores de aproximadamente 60 nucleotídeos, conhecidos como miRNA prematuros (pre-miRNA), que formam uma dupla-fita imperfeita ³⁴. Os pre-miRNAs são ativamente transportados ao citoplasma pela exportina 5 em associação com a RAN-GTPase ³⁵, onde são clivados pela ribonuclease denominada Dicer em miRNAs maduros com dupla fita (miR duplex) de aproximadamente 22 nucleotídeos ³⁶. O miR duplex é composto com uma fita que é incorporada ao complexo silenciador RNA-induzido (miRISC) e uma fita complementar que é degradada ³⁷. O miRISC, com auxílio das proteínas argonautas ³⁸, liga-se geralmente, mas não exclusivamente, à região não transcrita 3' (3'UTR) do seu mRNA alvo ³⁹ e pode causar a degradação do mRNA (para pareamento de bases quase perfeitos) ou a inibição da tradução de proteínas (para pareamento de bases imperfeitos) ³¹.

Figura 1. Transcrição e função de miRNAs. Após a transcrição do pri-miRNA de 3 a 4 quilobases, ocorre, ainda no núcleo, sua quebra em um ou mais pre-miRNAs de aproximadamente 60 nucleotídeos. A exportina 5 faz o transporte ativo deste precursor para o citoplasma. A ribonuclease Dicer cliva os pre-miRNAs em miRNAs maduros de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Uma das fitas é degradada e a outra é incorporada ao complexo silenciador RNA induzido (miRISC). Este complexo, com o auxílio das proteínas argonautas, reconhece o mRNA alvo, podendo causar sua degradação ou apenas inibir sua tradução.

MiRNAs regulam o processo metabólico celular através de mecanismos complexos incluindo interferências em moléculas chaves e em múltiplas vias de sinalização oncogênica⁴⁰. Estão envolvidos na sinalização intercelular, proliferação, crescimento, apoptose e diferenciação celular⁴¹. A desregulação de miRNAs pode ser consequência de alterações cromossômicas, modulação epigenética ou interação com outros genes⁴²; pode levar a expressão gênica anormal e associa-se a neoplasias sólidas e hematológicas⁴⁰.

Em 2002, os miR15a e miR16-1 foram identificados como potenciais genes associados à patogênese da LLC ⁴³. Este achado foi a primeira evidência de que os miRNAs poderiam ser importantes para a gênese tumoral.

Os miRNAs podem ter efeito tanto semelhante a genes supressores tumorais ⁴⁴, quanto a oncogenes ⁴⁵. Quando estão localizados em uma região deletada ou têm sua expressão reduzida em um tipo específico de câncer, seu efeito é semelhante ao de um oncogene, desde que os alvos principais para estes tipos celulares específicos sejam oncogenes. Quando estão localizados em uma região amplificada ou têm sua expressão aumentada em um tipo específico de câncer, seu efeito é semelhante ao de um supressor tumoral, desde que seu alvo principal para estes tipos celulares específicos sejam supressores tumorais ⁴⁴.

1.3 miR-15a e miR-16-1

A visão atual é de que as principais alterações genéticas da LLC levam à desregulação de miRNAs específicos que causam anormalidades transcricionais/pós-transcricionais. Um exemplo são os genes de miRNAs miR-15a e miR-16-1, localizados em um íntron do gene “*deleted in leukemia 2*” (DLEU2) no locus 13q14 e frequentemente excluídos e/ou hipoexpressos em pacientes com LLC ^{43; 46; 47; 48}. A hipoexpressão destes miRNAs pode ocorrer independentemente da presença de deleção 13q14 ⁴⁸. Deleções e translocações envolvendo miR15a e miR16-1 e a redução de sua expressão foram encontrados em aproximadamente 65% dos pacientes com LLC ⁴³.

Para estes miRNAs um número crescente de alvos têm sido descritos. A proteína BCL-2 (“B cell lymphoma 2”) ⁴⁴ e a alça de contra regulação MicroRNA/TP53 ⁴⁷ aparentam ser os de maior importância na patogênese e prognóstico da LLC.

A proteína BCL2 tem papel central na programação genética de células eucariotas, favorecendo a sobrevivência pela inibição da morte celular ⁴⁹. Com o auxílio de ferramentas de bioinformática, foi identificado que os miR-15 e miR-16 têm complementação de bases com o mRNA da BCL-2 ⁴⁴. A perda da supressão pelos miRNAs pode explicar o aumento da expressão de BCL2 e resultante proteção das

células contra a apoptose ^{44; 50; 51; 52}. Este parece ser um mecanismo regulatório envolvido na patogênese de grande parte dos casos de LLC ⁵³.

Em linhagens celulares leucêmicas e em células de LLC, o TP53 estimula a transcrição das famílias miR15a/16-1 e miR34b/34c ⁴⁷. Baseado em dados experimentais, demonstrou-se que 9 miRNAs reprimem diretamente o gene TP53, dentre eles os miR15a e miR16-1 ^{47; 54}. Este é um dos modelos patogênicos para a associação da del13q com formas indolentes de LLC.

Não há correlação entre o nível de expressão de miR15a e miR16-1 e a presença de alterações citogenéticas por FISH que não a del(13q14) ⁵⁵. Já quando se correlaciona com a presença de marcadores de mal prognóstico, como expressão de ZAP-70 e mutação da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IGHV), estudos demonstram resultados conflitantes ^{52; 55; 56; 57; 58; 59}.

Aumento da expressão de miR15a e miR16-1 é associado a pior prognóstico na LLC ⁵⁶. A explicação molecular para isto está no fato de que estes miRNAs podem regular tanto oncogenes quanto genes supressores tumorais e, pela regulação destes, influenciar negativamente algumas vias de oncosupressão, levando a um fenótipo mais agressivo ⁶⁰.

1.4 miR-29b

A família miR-29 contém, em humanos, os miR-29a, miR-29b e miR29c. O miR29b possui 2 membros, miR29b-1 e miR29b-2 ⁶¹. Os miR-29a e miR29b-1 são derivados de um mesmo gene localizado no cromossomo 7q32; miR29b-2 e miR29c são de um mesmo transcrito localizado em 1q32 ^{55; 62}. Como os membros maduros desta família compartilham a mesma sequência alvo, os genes regulados pelos miR-29s são semelhantes ⁶¹.

Estes miRNAs exercem suas funções tendo como alvo genes envolvidos no catabolismo de aminoácidos, senescência, diferenciação, proliferação, ciclo celular e apoptose, o que os torna reguladores efetivos da ocorrência e progressão tumoral ^{40; 61}. Eles têm, reconhecidamente, expressão aberrante em diversas neoplasias sólidas e hematológicas, porém os mecanismos detalhados não são bem

conhecidos ⁶¹. Há evidências de que os miR-29 podem ter função de supressores tumorais na LLC tendo como alvo oncogenes como TCL1 ⁶³, MCL1 ⁶⁴ e CDK6 ⁶⁵.

A expressão do miR-29b tende a ser reduzida em LLC agressiva e associada a mal prognóstico ⁵⁶, especialmente naquelas com deleção 11q ⁶³, 17p ⁶⁶ ou IGHV não-mutado ⁵². Estudo realizado por Li et al. demonstrou hiperexpressão de miR29b em LLC quando comparado a controles normais ⁶⁷.

1.5 miR-34a

Em mamíferos, a família miR34 é composta por 3 diferentes miRNAs codificados por 2 genes distintos ⁶⁸. O miR34a é localizado no cromossomo 1p36, tem o seu transcrito próprio e é expresso em praticamente todos os tecidos, excetuando-se os pulmões. Os miR34b e miR34c são localizados no cromossomo 11q23, compartilham o mesmo transcrito, são expressos principalmente em tecido pulmonar e pouco expressos em outros tecidos ^{69; 70}. A alta similaridade entre os membros desta família sugere que tenham alvos semelhantes, podendo haver diferenças de afinidades ⁶⁸.

A proteína p53 potencializa a expressão dos miR-34a e miR-34b,c ligando-se às regiões promotoras nos cromossomos 1p36 e 11q, respectivamente ⁷¹. O miR34a faz parte de uma alça de contra regulação positiva que leva ao aumento da ativação da p53 ^{68; 70; 72}.

A indução dos genes miR34 permite à p53 regular a expressão de grande número de proteínas, mesmo após seus transcritos já terem sido sintetizados. Perda do miR34 por mecanismos genéticos e epigenéticos interrompe esta contra regulação, resultando em redução da atividade p53, o que causa vantagem seletiva para as células neoplásicas ⁶⁸.

Em LLC, o aumento de expressão de miR-34a é associado a eixo p53 intacto, já a baixa expressão é associada a deleção 17p ⁷¹, doença refratária a fludarabina mesmo na ausência de deleção 17p, resposta defeituosa a danos em DNA ⁷³ e deleção de TP53 ^{59; 73; 74; 75}. Visone et al. encontraram baixa expressão de miR-34a em células de LLC com del17p e com IGHV não mutado, mas não nos pacientes com esta mesma alteração citogenética e IGHV mutado ⁶⁶.

Apesar de ter sido demonstrado que a hipoexpressão de miR-34a está associada a menor tempo de duplicação de linfócitos e a redução da sobrevida livre de tratamento, não há associação da expressão deste miRNA com expressão de CD38, presença de del13q14, trissomia do 12 ou estado de mutação IGHV na ausência de del17p⁷².

1.6 miR-155

O miR-155 é transcrito do gene “*B-cell Integration Cluster*” (BIC) localizado no cromossomo 21^{76; 77}. Expresso em vários tecidos e tipos celulares, pode ter papel fundamental em processos biológicos, como a hematopoese, inflamação e resposta imunológica⁷⁸. Considerando que o nível deste miRNA é elevado em tumores sólidos^{79; 80} e hematológicos^{45; 66; 81}, sua regulação aberrante pode ter papel significativo na carcinogênese.

Aparentemente, o miR-155 é fundamental para o funcionamento da célula B. Aumento dos seus níveis em doenças linfoproliferativas, incluindo LLC, pode causar bloqueio na diferenciação e acúmulo de células linfoides⁸².

Em LLC, o miR-155 é expresso dependendo do estado de metilação do seu gene promotor e do fator de transcrição MYB⁸². Sua hipoexpressão resulta em aumento da expressão de vários genes alvo, principalmente o fator de transcrição PU.1⁸², a enzima citidina deaminase indutora da ativação (AID)⁸³ e a fosfatase associada ao recepto de células B (BCR) SHIP-1⁸⁴. A programação desregulada de MYB, miR-155 e PU.1 potencialmente detém fatores importantes para o avanço dessa neoplasia⁸².

A hiperexpressão de miR-155 foi correlacionado a fatores laboratoriais indicativos de pior prognóstico na LLC, como expressão de ZAP-70 e presença de IGHV não mutada^{56; 85}. Além disso, também demonstrou-se correlação com menor sobrevida livre de tratamento^{56; 85; 86}.

1.7 miR-181a e miR-181b

A família miR181 possui 4 membros (miR-181a, miR-181b, miR-181c e miR-181d), está presente em diferentes espécies e tem envolvimento em diversas neoplasias. Destes, os miR-181a e miR-181b, localizados nos mesmos loci dos cromossomos 1q31.1 e 9q3.33, são os mais estudados ⁸⁷.

Os miRNAs 181 são expressos especificamente em células hematopoéticas, cérebro e pulmões. Em camundongos, o miR181a tem papel na diferenciação de progenitores hematopoéticos para a linhagem B, por mecanismo ainda não conhecido ⁸⁸. Na regulação do ciclo e diferenciação celular, os miRNAs 181 podem agir induzindo apoptose, por serem reguladores endógenos da expressão de múltiplos oncogenes ⁸⁹.

As proteínas TCL-1, BCL-2, MCL-1, XIAP e k-RAS encontram-se elevadas em células de LLC e contribuem para a resistência à apoptose ^{63; 84; 89}. Estas proteínas foram identificadas como potenciais alvos dos miR181a e miR181b ^{52; 89; 90}. Em murinos, o aumento da expressão de TCL1 leva ao desenvolvimento neoplasia semelhante à LLC ⁹¹.

Estes miRNAs aparentemente têm função similar à do miR34a na via da p53. Transcrição de pri-miRNA-181a e 181b é ativada diretamente pela p53 e estes miRNAs promovem a parada do ciclo celular e apoptose. Por outro lado, apesar de suas funções como contrarreguladores negativos da p53, miR34a e miR181s aparentemente influenciam contrarreguladores positivos desta proteína, levando à sua ativação ⁸⁹.

Em portadores de LLC, a hipoexpressão de miR181a e miR181b foi associada a fatores de mal prognóstico como IGHV não mutado e positividade para CD38 ⁵². Hipoexpressão somente de miR181b está relacionada à redução da sobrevida global e da sobrevida livre de tratamento ⁷⁵. O miR-181a tem expressão aumentada em pacientes com LLC refratários a fludarabina ⁹².

1.8 miRNAs na patogênese da LLC

Levando em consideração tudo o que foi exposto acima, não é surpresa que os miRNAs têm sido descritos como instrumentos na patofisiologia da LLC.

Diversos grupos de pesquisadores tentam identificar o papel dos miRNAs em diferentes neoplasias, na esperança de que este conhecimento possa ser útil para a exploração de novas vias e mecanismos de regulação da evolução neoplásica e que possibilitem o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, prognóstico e de terapia.

Apesar dos avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatogênese da LLC, seus mecanismos e iniciação e progressão ainda permanecem desconhecidos.

1.9 Telômeros

Em vertebrados, telômeros consistem em sequências repetitivas de DNA (TTAGGG) revestidas por proteínas protetoras (shelterinas) localizados nas pontas dos cromossomos lineares^{93; 94; 95}. Os telômeros têm estruturas especializadas para proteção dos cromossomos e são reduzidas progressivamente a cada ciclo de replicação celular, devido à inabilidade da DNA polimerase em replicar completamente o final 3' dos cromossomos⁹⁶. Esta redução progressiva é um mecanismo importante no controle do potencial replicativo celular; quando a erosão telomérica atinge um certo ponto, a célula cessa a proliferação e inicia senescência e apoptose (Figura 02).

Figura 2. Estrutura dos telômeros e complexo telomerase. A) Telômeros são formados por DNA de fita dupla com repetição da sequência TTAGGG associadas às shelterinas. Fita 3' apresenta protrusão em sua terminação (*overhang*), que invade a fita 5' formando uma estrutura de *loop*. B) Enzima telomerase transcriptase reversa (TERT), o componente de RNA (TERC), a proteína discerina e outras proteínas associadas à estabilização do complexo da telomerase (NHP2, NOP10 e GAR1). Adaptado de Palm e De Lange (2008) e Calado e Young (2012).

Enquanto a manutenção do comprimento telomérico pela telomerase é importante para preservar o potencial replicativo das células neoplásicas, as erosões teloméricas podem impedir sua função de proteção cromossômica, resultando em instabilidade genética⁹⁷. Existem evidências significantes de que erosões e fusões teloméricas têm papel importante na patologia de neoplasias comuns em humanos⁹⁸, incluindo a LLC^{97; 98; 99}.

Nessa leucemia, apesar do baixo índice proliferativo, os telômeros são anormalmente reduzidos¹⁰⁰ e há baixa expressão de telomerase¹⁰¹. Os estágios iniciais desta neoplasia são associados a desproteção telomérica, o que não pode ser explicado simplesmente pelo encurtamento telomérico, enquanto estágios avançados apresentam telômeros criticamente curtos, causando danos ao DNA e fusão cromossômica¹⁰².

Portadores de LLC têm comprimento telomérico reduzido quando comparados a controles normais^{103; 104}. Esta redução não é dependente da idade^{103; 105}, é relacionada ao estágio clínico de Binet^{105; 106} à ausência de mutação IGHV^{103; 104; 105; 107; 108; 109; 110; 111; 112; 113; 114} e a alterações citogenéticas que não deleção do 13q¹⁰⁵. A sua correlação com a expressão de CD38 é controversa; há estudos que encontraram correlação^{107; 109} e outros que concluíram não haver¹⁰³. A correlação com expressão de ZAP-70 também é controversa, segundo Lin et al. e Roos et al., há correlação entre telômero curto e positividade para ZAP-70^{105; 109}; já segundo Hoxha et al., esta associação não existe¹⁰³.

Segundo Ricca et al. e Grabowski et al., a distinção de pacientes com telômeros mais curtos e mais longos em pacientes com IGHV não-mutado consegue separar grupos com melhor e pior prognóstico, sendo os com telômeros mais longos com prognóstico mais favorável^{111; 112}.

Não é bem definido se o encurtamento telomérico pode ser considerado fator de mal prognóstico na LLC. Há aqueles que encontraram haver esta correlação^{97; 100; 104; 105; 106; 107; 108; 109; 111; 112; 113; 114; 115; 116} e os que afirmam não haver^{99; 103}.

2 JUSTIFICATIVA

A LLC é uma doença de apresentação e curso heterogêneos que ainda não teve seus mecanismos fisiopatogênicos bem elucidados. Acredita-se que o estudo da LBM, condição precursora da LLC, possa contribuir para o melhor conhecimento desta patologia.

Poucos estudos investigaram alterações em expressões de miRNAs em LBM^{11; 86} e o comprimento telomérico de indivíduos com esta condição nunca foi pesquisado. Desta forma, o conhecimento de possíveis diferenças nesses fatores reconhecidamente indutores de neoplasia podem contribuir para melhor elucidação da fisiopatogênese da LLC.

3 OBJETIVOS

- 1- Identificar a expressão dos miRNAs 15a, 16-1, 29b, 34a, 155, 181a e 181b em células B CD5+ de pacientes portadores de LLC Binet A e indivíduos com LBM clínica e LBM populacional e comparar os resultados encontrados entre os grupos e com a expressão em indivíduos saudáveis.
- 2- Identificar o comprimento dos telômeros dos linfócitos B CD5+ de pacientes com LLC Binet A, LBM clínica e LBM populacional e comparar os resultados encontrados entre os grupos e com comprimento dos telômeros de indivíduos saudáveis;

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Grupos de voluntários

Trinta e oito voluntários em seguimento no ambulatório de hematologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) foram incluídos neste estudo. Vinte e um pacientes com diagnóstico de LLC de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde para tumores hematopoéticos e de tecidos linfoides ¹, todos virgens de tratamento e classificados como Binet A ¹¹⁷; onze indivíduos com o diagnóstico de LBM clínica e seis com o diagnóstico de LBM populacional, de acordo com a classificação estabelecida por Marti ⁶. Os portadores de LBM populacional foram diagnosticados em estudo anterior com familiares de primeiro-grau de pacientes com LLC esporádica, realizado no Laboratório de Hematologia do HCRP ¹¹⁸. Amostras de 10 voluntários saudáveis foram utilizadas como controle normal para os estudos de miRNA.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.2 Citometria de fluxo

Após consentimento informado, a imunofenotipagem do diagnóstico dos pacientes portadores de LLC foi revisada e o diagnóstico confirmado de acordo com a classificação de Matutes ¹¹⁹ modificada por Moreau ¹²⁰.

Para a população portadora de LBM e para os controles normais, realizamos a pesquisa de doença residual mínima de LLC por citometria de fluxo, conforme descrito por Rawstron ⁷ e detalhada a seguir. Todos os casos de LBM foram estudados novamente após 3 meses para confirmação diagnóstica.

Após consentimento informado, as amostras de sangue periférico foram colhidas em frascos com EDTA. Células mononucleares foram separadas em

centrifugação por gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) e lavadas duas vezes com PBS [salina tamponada com fosfato suplementada com 1% de albumina sérica humana (PBS/HSA; Bayer, Elkhart, IL)].

Distribuímos as células mononucleares em 4 tubos para citometria, com $1,0 \times 10^6$ células em cada. O painel de citometria foi constituído pelas seguintes combinações de anticorpos: (i) células sem marcação; (ii) CD19 [*PE-cyanin 5* (PE-Cy5)], CD5 [*allophycocyanin* (APC)]; (iii) CD20 [*fluorescein isothiocyanate* (FITC)], CD79b [*phycoerythrin* (PE)], CD19 (PE-Cy5), CD5 (APC); (iv) anti- κ (FITC), anti- λ (PE), CD19 (PE-Cy5), CD5 (APC). Todos os anticorpos foram fabricados pela BD Biosciences. Adicionamos 5,0 μ L de cada anticorpo e incubamos no escuro a 4°C por 15 minutos. Após lavar com solução de PBS acrescido de Azida 0,1% e 2,5% de soro bovino fetal, diluímos em 300 μ L de PBS com formaldeído 1% e adquirimos 300.000 eventos de cada tubo, com o citômetro de fluxo de 4 cores FACSCalibur (Becton Dickinson).

Utilizamos o “Cell Quest software” (Becton Dickinson) para aquisição e análise. A estratégia de sequenciamento de “gates” é demonstrada nas Figuras 3 e 4. Uma região inicial (R1) foi determinada nas células com CD19 de alta expressão e baixa granularidade; uma segunda região (R2) foi determinada pelas características físicas das células CD19⁺, excluindo restos celulares e pequenas células apoptóticas, assim como células conjugadas (“doublets”) e monócitos; uma terceira região (R3) foi determinada para excluir células que se ligaram a quantidades equivalentes tanto de CD5 quanto de CD19 – estas células ficam em uma linha diagonal que pode indicar ligação inespecífica. As análises descritas a seguir foram realizadas nos eventos contidos nas 3 regiões. Células com fenótipo de LLC foram identificadas na população de células B pela sua alta expressão de CD5 (R4 e R5) e baixa de CD20 (R4 e R6) e CD79b (R5 e R6). A população foi classificada como tendo o fenótipo de LLC se houvesse mais de 50 eventos em todas as 3 “regiões de LLC” (R4, R5 e R6) e sua expressão de cadeia leve de imunoglobulina fosse anormal ($\kappa/\lambda < 0,5$ ou > 4 ou $> 25\%$ sem imunoglobulina de superfície).

Figura 3. Imunofenotipagem para LBM. (R1) Expressão forte de CD19 e baixo SSC. (R2) Baixo FSC e SSC. (R3) Positividade para CD5 em células CD19+. (R4), (R5) e (R6) População de células B anormais com baixa expressão de CD20 e CD79b. A e B demonstram população monoclonal de células B CD5+.

Figura 4. Imunofenotipagem normal. Demonstra as mesmas regiões descritas na figura anterior, sem população bem definida de células B CD20 e CD79b de baixa expressão. A e B demonstram policlonalidade de células B.

4.3 Purificação de linfócitos B

Logo após a coleta, submetemos as amostras a citometria de fluxo para isolamento de células CD19+ dos voluntários normais e CD19+CD5+ dos portadores de LLC e de LBM. Utilizamos estratégia adaptada de protocolo descrito anteriormente¹²¹.

Separamos células mononucleares por gradiente de densidade de centrifugação utilizando Ficoll Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Após serem lavadas por duas vezes com PBS, foram diluídas em RPMI Medium 1640 (GIBCO). Dividimos as células em 4 tubos para citometria, sendo 3 deles para calibração do citômetro e outro para a separação celular. Os 3 primeiros continham $0,5 \times 10^6$ células/tubo e foram marcados da seguinte maneira: (i) células sem anticorpos; (ii) 5,0µL de CD19FITC; (iii) 5,0µL de CD5APC. As demais células mononucleares foram suspensas em RPMI Medium 1640 (GIBCO) a uma concentração máxima de 50×10^6 e marcadas com CD19FITC e CD5APC ao volume de 2,0µL para cada $2,0 \times 10^6$ células. As alíquotas foram incubadas protegidas da luz a 4°C por 15 minutos. A seguir, foram lavadas por 2 vezes com PBS, suspensas em RPMI Medium 1640 (GIBCO) à concentração de 15 a 20×10^6 células/mL, para separação celular. Utilizamos os citômetros de fluxo JSAN (Bay Bioscience) e FACSARIA (Becton Dickinson). Seleccionamos o modo de alta pureza por adição de carga à gotícula que continha a célula de interesse.

Após a separação celular, uma alíquota foi retirada para a verificação da pureza da população selecionada, nas amostras em que foi possível obter mais que 500.000 células.

A pureza média das amostras de LLC foi de 90,59% (variando de 70% a 99,56%); a de LBM clínica foi de 88,33% (variando de 66% a 97%) e a dos controles normais foi de 98,89% (variando de 98,32% a 99,57%). Não obtivemos mais que 500.000 células em nenhuma amostra de LBM populacional.

As amostras obtidas foram divididas em 2 alíquotas com 0,2 a $1,0 \times 10^6$ células, uma para extração de DNA outra para extração de RNA. Ambos os processos foram iniciados imediatamente.

4.4 Extração de RNA e RT-qPCR para expressão de miRNA

RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol LS (Ambion, Life Technologies), conforme orientação do fabricante com modificações. As células foram centrifugadas a 2000xg por 4 minutos e o sobrenadante desprezado. Rediluímos em 250µL de PBS, homogeneizamos e adicionamos 750µL de Trizol LS para lise celular, aspirando esta suspensão com pipeta por diversas vezes. Conservamos as amostras a -80°C.

Para a continuidade da extração do RNA, seguimos os seguintes passos: (i) descongelar as amostras à temperatura ambiente; (ii) adicionar 10µL de glicogênio na concentração de 20mg/mL e 200µL de clorofórmio; (iii) homogeneizar vigorosamente; (iv) centrifugar a 12000xg por 15 minutos a 4°C; (v) transferir o sobrenadante para um novo tubo e precipitar o RNA pela adição de 500µL de isopropanol a 100%; (vi) incubar as amostras por uma noite a -20°C; (vii) centrifugar a 12000xg por 15 minutos a 4°C; (viii) remover todo o sobrenadante e lavar o precipitado com 1mL de etanol a 75%; (ix) homogeneizar em Vortex por aproximadamente 15 segundos; (x) centrifugar a 7500xg a 4°C por 10 minutos; (xi) desprezar o sobrenadante e deixar o precipitado secar à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos; (xii) ressuspender o precipitado em 12µL de água tratada com DEPC e livre de nucleases. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria através do NanoVue (General Eletrics).

Selecionamos sete miRNAs maduros (miR-15a, miR-16-1, miR-29b, miR-34a, miR-181a, miR-181b e miR-155) com expressão alterada em pacientes com LLC, de acordo com dados da literatura. As expressões destes miRNAs maduros foram analisadas pelos métodos de transcrição reversa e posteriormente pela reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), conforme descrito por Chen¹²² e Schmittgen¹²³ com algumas modificações.

Para a transcrição reversa (RT), utilizamos o TaqManTM MicroRNA Reverse Transcription KIT (Applied Bio-systems) e *stem loop RT primers* específicos para cada miRNA. Todas as reações foram realizadas com no máximo 3 *primers*. Combinamos 5ng de RNA a 15µL de solução para RT composta por: 1,5µL de tampão RT-PCR (10x); 1µL de enzima Multi-Scribe (50U/µL); 0,15µL dNTP mix (100x) 0,188µL de inibidor RNase (1,9U); 1,0µL de RT *primers* específicos e água

livre de nucleases suficiente para atingir o volume final da reação. As reações RT foram incubadas em termociclador GeneAMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e resfriado a 4°C. Todas as reações foram realizadas no mesmo aparelho. O cDNA foi diluído 4 vezes em água livre de nucleases. As amostras de DNA complementar (cDNA) foram armazenadas a -20°C.

Após a reação de RT e a diluição do cDNA resultante, a reação de qPCR foi realizada utilizando Universal Master Mix (Applied Biosystems). Para reação com volume final de 10µL, combinamos 5,0µL de Universal Master Mix, 0,5µL de sonda específica para cada miRNA e 4,5µL de cDNA diluído. As reações de PCR foram realizadas no termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em placas de 96 poços [MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)], seladas com folhas adesivas transparentes [MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems)], sob as seguintes condições: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas no mesmo aparelho.

As amostras foram estudadas em duplicatas e normalizadas pelo cálculo da média geométrica dos Cts dos RNAs nucleolares RNU24, RNU44 e RNU48 [Taqman miRNA Assay (Applied Biosystems)], que obtiveram expressão uniforme em todas as amostras. Em cada reação de miRNA e de gene controle, havia controle negativo também em duplicata.

Para a análise dos resultados, ajustamos o *threshold* manualmente em 0,2 para todas as reações, conforme orientação do fabricante dos *primers* e sondas. O nível de miRNA foi mensurado pelo uso do ciclo limiar (Ct). As expressões dos miRNAs, normalizadas pela média geométrica da quantificação dos genes endógenos, foram calculadas por $2^{-\Delta Ct}$. As reações foram repetidas quando o coeficiente de variação (CV) era maior que 2%, calculado pela razão entre o desvio padrão e a média aritmética dos Cts das duplicatas de cada amostra.

Amostras que mantiveram CVs maiores que 2% após a terceira repetição foram consideradas inadequadas e desconsideradas para o estudo daquele miRNA. Tomamos esta conduta para evitar o efeito Monte Carlo, que ocorre quando o gene alvo encontra-se em baixa concentração na amostra, o que propicia ligações inespecíficas do *primer* e causa resultados falso positivos.

4.5 Extração de DNA e qPCR para comprimento telomérico

Para extração de DNA, utilizamos o Kit Gentra Puregene Blood® (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante com modificações. Realizamos os seguintes passos: (i) centrifugar as amostras a 2000xg por 4 minutos e desprezar o sobrenadante; (ii) suspender em 300µL de Solução de Lise de GB e homogeneizar vigorosamente; (iii) adicionar 200µL da Solução de Precipitação de Proteínas e homogeneizar vigorosamente (Vortex) por 20 segundos; (iv) centrifugar a 2000xg por 5 minutos; (v) transferir o sobrenadante (cerca de 400µL) isento de contaminantes para um tubo novo; (vi) para a precipitação do DNA, utilizar 500µL (ou volume/volume) de isopropanol absoluto gelado; (vii) homogeneizar as amostras por inversão até a visualização de um precipitado; (viii) centrifugar as amostras a 2000xg por 3 minutos; (ix) descartar o sobrenadante; (x) após a precipitação, lavar o DNA em 500µL de Etanol 70%, invertendo o tubo algumas vezes; (xi) centrifugar novamente a 2000xg por 3 minutos; (xii) descartar o sobrenadante, apoiar os tubos invertidos sobre um papel absorvente e esperar 10 minutos para secagem; (xiii) por último, adicionar de 30 a 50µL de Solução de Hidratação (Hydration Solution), de acordo com o tamanho do precipitado. Mantivemos a amostra na geladeira a 4°C por pelo menos 24 horas antes da quantificação.

Determinamos o comprimento telomérico pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), baseado na descrição de Cawthon com algumas modificações¹²⁴. Este método é realizado por meio de duas reações, uma para o telômero (T), usando o seguinte par de primers: “*forward*” 5’CGGTTTGTGGGTTTGGGTTTGGG TTTGGGTTTGGGTT3’ e “*reverse*” 5’GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACC CTTACCCTTACCCT3’; e outra para o “*single gene*” (S) ou gene de cópia única, utilizando os primers: “*forward*” 5’CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC3’ e “*reverse*” 5’CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA3’. Cada amostra foi analisada em triplicada com volume final da reação de 24µL composto por 1,6ng de DNA genômico em um volume de 8µL, 300nM de cada *primer* (exceto para o *primer reverse* do SG, que conteve 500nM) em 4µL e 12µL de “Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix” (Qiagen). Todos os reagentes e amostras foram pipetados em discos de 100 poços utilizando a plataforma QIAgility (Qiagen). A reação dos telômeros foi realizada em

25 ciclos, sob as seguintes condições: 95°C por 5 minutos de desnaturação e ciclos de 98°C por 7 segundos e 60°C por 10 segundos. A reação do *single gene* foi realizada em 35 ciclos, sendo 95°C por 5 minutos para desnaturação e ciclos de 98°C por 7 segundos e 58°C por 10 segundos. Todas as reações foram realizadas com o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen).

O comprimento telomérico de cada amostra (x) foi obtido pelo cálculo da razão T/S, divisão dos valores de Ct (ciclo em que a curva de amplificação atravessa o limiar) do ensaio específico para telômeros, normalizados pelo gene de cópia única, [Ct(T)/Ct(S)]. O comprimento telomérico é expresso em razão T/S relativa, normalizada pela razão média T/S da amostra de referência, proveniente da curva padrão ($2^{-(\Delta C_{tx} - \Delta C_{tr})} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$). A construção da curva-padrão de todos os ensaios foi realizada utilizando um mesmo DNA referência em 6 diluições seriadas, com quantidades finais entre 0,3125 e 10ng. Para uma mesma amostra, aceitou-se coeficiente de variação para os valores de Ct nas reações do telômero e SG inferiores a 2 e 1%, respectivamente.

Para a correção do comprimento telomérico pela idade, utilizamos, com autorização, grupo controle de indivíduos saudáveis avaliado em estudo de mestrado realizado no Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – FMRP – USP¹²⁵. Nesta pesquisa, foram definidos por qPCR o comprimento telomérico de 261 voluntários de 0 a 86 anos.

4.6 Análise estatística

Na análise estatística da expressão de miRNAs, fizemos inicialmente o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis que não rejeitaram a hipótese de normalidade, aplicamos o método de Análise de Variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa, aplicamos o teste *post hoc* de Bonferroni. Para as variáveis que rejeitaram a hipótese de normalidade, aplicamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrica). Quando houve diferença significativa, aplicamos o teste *post hoc* de Dunn. Consideramos a comparação como significativa quando $p < 0,05$.

Utilizamos o método de Análise de Co-variância (ANCOVA) para o estudo estatístico do comprimento telomérico e idade na comparação entre os 4 grupos. Este método permite comprovar se há diferença no comprimento telomérico levando em consideração a idade dos indivíduos estudados.

Para análise do comprimento telomérico ajustado para a idade, utilizamos o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste confirmatório de Dunn.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas:

As características dos pacientes portadores de LLC, indivíduos com LBM clínica e populacional e do grupo controle estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Características clínicas dos portadores de LLC, LBM clínica, LBM populacional e controles normais participantes do estudo.

Característica	Controle	LBM populacional	LBM clínica	LLC
Número de voluntários	10	6	12	21
Idade média	38,6	69	77,83	69,71
variação (anos)	25 - 60	53 - 82	57 - 97	58 - 81
Sexo				
Masculino	2	5	9	11
Feminino	8	1	3	10
Contagem de linfócitos média	2.064	1.466	3.933	41.714
variação (/μL)	1.360 - 3.300	800 - 2100	2.900 - 5.900	7.500 - 147.000
% Linfócitos B CD5+ dentro do total de linfócitos	-	1,68	34,9	78,02
variação (%)	-	0,72 - 3,43	5,97 - 61,01	58,63 - 91,09

A idade dos indivíduos com diagnóstico de LLC, LBM populacional e LBM clínica foi estatisticamente semelhante. Quando comparamos estes 3 grupos com o grupo controle, identificamos diferença significativa ($p < 0,001$). Considerando não haver descrição de que a expressão de miRNAs varie com a idade, esta diferença não interfere com os resultados do estudo.

Entre os quatro grupos, não houve semelhança na relação entre a quantidade de indivíduos do sexo masculino e feminino. Assim como ocorre com a idade, não existe descrição de que a expressão de miRNAs varie entre os gêneros.

A contagem de linfócitos foi estatisticamente semelhante nos grupos Controle, LBM populacional e LBM clínica. Apesar de não ter havido diferença estatística, o grupo LBM clínica teve média mais alta quando comparado aos outros dois grupos, devido a própria definição desta entidade. A contagem de linfócitos dos pacientes

com LLC foi significativamente mais elevada que nos outros grupos, pelos próprios critérios diagnóstico desta patologia.

5.2 Expressão de miRNAs

Analizamos a expressão dos miRNAs 15a, 16-1, 29b, 34a, 155, 181a e 181b em pacientes com LLC Binet A, indivíduos com LBM clínica e voluntários sadios. Devido ao baixo número de células B CD5+ nos indivíduos com LBM populacional e, consequentemente, à quantidade e qualidade limitadas de RNA para análise adequada de miRNAs, optamos por excluir este grupo destas análises.

Estudamos 43 indivíduos, sendo 21 no grupo LLC, 12 no grupo LBM e 10 no grupo controle. Para os miRNAs 15a, 29b e 155 obtivemos, para todas as amostras estudadas, resultados de RT-qPCR que alcançaram os padrões de qualidade exigidos neste estudo e descritos acima. Para a análise dos demais miRNAs, excluimos algumas amostras por não atingirem estes padrões de qualidade, o que se deu da seguinte forma: miRNA 16-1 excluimos 4 amostras do grupo LLC, 3 do grupo LBM e 1 do grupo Controle; miR34a excluimos 1 amostra do grupo LLC e 2 do grupo controle; miR181a excluimos 1 do grupo LLC e miR181b excluimos 1 amostra de cada grupo

Figura 5. Disposição dos voluntários. A) miRNAs 15a, 29b e 155; B) miRNA 16-1; C) miRNA 34a; D) miRNA 181a; E) miRNA 181b.

A expressão dos miRNAs 15a, 16-1, 29b, 181b e 155 demonstrou distribuição normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram analisadas pelo método da Análise de Variância (ANOVA) e, quando houve diferença significativa, utilizamos o teste *post hoc* de Bonferroni.

A expressão dos miRNAs 34a e 181a não demonstrou distribuição normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram analisadas pelo método não-paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrica) e, quando houve diferença significativa, aplicamos o teste *post hoc* de Dunn.

O miRNA155 foi o único que demonstrou diferença na expressão entre os grupos LLC e LBM, tendo sido mais expresso nas células de LLC ($p=0,002$). Esta diferença de expressão foi ainda maior quando comparado o grupo LLC com o grupo controle ($p<0,001$). Apesar de o grupo LBM demonstrar uma tendência e ter

expressão aumentada deste miRNA quando comparado ao Controle, esta diferença não teve significância estatística, talvez pelo número reduzido de amostras estudadas (figura 6).

Figura 6. Expressão de miR-155 em pacientes com LLC, LBM e controles normais medido por RT-qPCR. Gráfico demonstra média de expressão com intervalo de confiança de 95%. Comparação entre grupos: LLC x LBM, $p=0,002$; LLC x Normal, $p<0,001$; LBM x normal, estatisticamente semelhantes.

Semelhante ao que encontramos para o miRNA155, a expressão do miRNA34a encontra-se aumentada nas células com fenótipo anormal. Tanto o grupo LBM quanto o grupo LLC têm expressão maior quando comparados com o grupo controle ($p=0,003$ e $p=0,02$, respectivamente). Não houve diferença na expressão deste miRNA entre os grupos LLC e LBM (figura 7).

Figura 7. Expressão de miR-34a em pacientes com LLC, LBM e controles normais medido por RT-qPCR. Gráfico demonstra média de expressão com intervalo de confiança de 95%. Comparação entre grupos: LLC x LBM, estatisticamente semelhantes; LLC x Normal, $p=0,02$; LBM x normal, $p=0,003$.

A expressão dos miRNAs 15a, 16-1, 181a e 181b é reduzida nas células com fenótipo anômalo. A expressão destes miRNAs é semelhante nos grupos LBM e LLC. Quando comparamos o grupo LLC com o grupo Controle, há maior expressão nas células normais ($p < 0,001$ para todos os miRNAs). O mesmo ocorre ao compararmos o grupo LBM com o grupo Controle ($p < 0,001$ para os miRNAs 15a, 16-1 e 181b e $p = 0,003$ para o miRNA 181a) (figura 8).

Figura 8. Expressão dos miRNAs 15a, 16-1, 181a e 181b em pacientes com LLC, LBM e controles normais medido por RT-qPCR. Gráficos demonstram média de expressão com intervalo de confiança de 95%. A) miR-15a. Comparação entre grupos: LLC x LBM, estatisticamente semelhantes; LLC x Normal, $p < 0,001$; LBM x normal, $p < 0,001$. B) miR-16-1. Comparação entre grupos: LLC x LBM, estatisticamente semelhantes; LLC x Normal, $p < 0,001$; LBM x normal, $p < 0,001$. C) miR-181a. Comparação entre grupos: LLC x LBM, estatisticamente semelhantes; LLC x Normal, $p < 0,001$; LBM x normal, $p = 0,003$. D) miR-181b. Comparação entre grupos: LLC x LBM, estatisticamente semelhantes; LLC x Normal, $p < 0,001$; LBM x normal, $p < 0,001$.

A análise de expressão do miRNA29b foi a única que demonstrou ser semelhante entre os 3 grupos estudados (figura 9).

Figura 9. Expressão de miR-155 em pacientes com LLC, LBM e controles normais medido por RT-qPCR. Gráfico demonstra média de expressão com intervalo de confiança de 95%. Comparação entre grupos: LLC x LBM, estatisticamente semelhantes; LLC x Normal, estatisticamente semelhantes; LBM x normal, estatisticamente semelhantes.

Tabela 3. Comparação da expressão dos miRNAs 155, 34a, 15a, 16-1, 181a, 181b e 29b em voluntários normais, portadores de LBM Clínica e pacientes com LLC Binet A.

		Normal	LBM	LLC	p
miR-155	Indivíduos Estudados	10	12	21	-
	Expressão Mínima	0,13	0,16	0,12	-
	Expressão Máxima	0,37	1,29	2,97	-
	Mediana de Expressão	0,25	0,58	1,26	-
	Desvio Padrão	0,08	0,33	1,59	-
	Normal X LBM	-	-	-	-
	Normal X LLC	-	-	-	< 0,001
	LBM X LLC	-	-	-	0,002
miR-34a	Indivíduos Estudados	8	12	20	-
	Expressão Mínima	0,41	0,96	0,65	-
	Expressão Máxima	2,89	104,10	7,85	-
	Mediana de Expressão	1,38	11,02	4,56	-
	Desvio Padrão	0,86	28,88	2,12	-
	Normal X LBM	-	-	-	0,003
	Normal X LLC	-	-	-	0,02
	LBM X LLC	-	-	-	-
miR-15a	Indivíduos Estudados	10	12	21	-
	Expressão Mínima	2,27	0,13	0,04	-
	Expressão Máxima	5,59	2,93	3,58	-
	Mediana de Expressão	3,84	1,33	1,24	-
	Desvio Padrão	0,992	0,92	1,02	-
	Normal X LBM	-	-	-	< 0,001
	Normal X LLC	-	-	-	< 0,001
	LBM X LLC	-	-	-	-

		Normal	LBM	LLC	p
miR-16-1	Indivíduos Estudados	9	9	17	-
	Expressão Mínima	42,30	2,73	1,80	-
	Expressão Máxima	74,27	32,11	58,66	-
	Mediana de Expressão	49,24	14,47	15,19	-
	Desvio Padrão	10,00	8,49	14,35	-
	Normal X LBM	-	-	-	< 0,001
	Normal X LLC	-	-	-	< 0,001
	LBM X LLC	-	-	-	
miR-181a	Indivíduos Estudados	10	12	20	-
	Expressão Mínima	17,36	1,37	0,19	-
	Expressão Máxima	53,98	23,53	16,13	-
	Mediana de Expressão	30,68	3,53	2,77	-
	Desvio Padrão	11,68	6,03	4,32	-
	Normal X LBM	-	-	-	0,003
	Normal X LLC	-	-	-	< 0,001
	LBM X LLC	-	-	-	
miR-181b	Indivíduos Estudados	9	11	20	-
	Expressão Mínima	137,05	22,89	14,62	-
	Expressão Máxima	1001,14	413,90	276,51	-
	Mediana de Expressão	332,15	93,11	73,92	-
	Desvio Padrão	321,39	108,68	75,98	-
	Normal X LBM	-	-	-	< 0,001
	Normal X LLC	-	-	-	< 0,001
	LBM X LLC	-	-	-	
miR-29b	Indivíduos Estudados	10	12	21	-
	Expressão Mínima	3,57	0,48	0,36	-
	Expressão Máxima	7,47	9,01	7,85	-
	Mediana de Expressão	4,24	2,12	4,56	-
	Desvio Padrão	1,38	2,45	2,12	-
	Normal X LBM	-	-	-	
	Normal X LLC	-	-	-	
	LBM X LLC	-	-	-	

5.3 Comprimento telomérico

Avaliamos o comprimento do telômero de 20 pacientes portadores de LLC, 09 indivíduos com LBM clínica e 04 indivíduos com LBM populacional. Excluímos 1 paciente do grupo LLC, 3 do grupo LBM clínica e 2 do grupo LBM populacional por não termos obtido resultados de qPCR confiáveis com o DNA extraído inicialmente.

O paciente portador de LLC havia evoluído para Binet C quando propusemos nova coleta. Os 3 indivíduos com LBM clínica não aceitaram realizar nova coleta. Dos 2 indivíduos com LBM populacional, não obtivemos DNA de qualidade boa o suficiente para análise de comprimento telomérico mesmo após três tentativas.

Figura 10. Fluxograma demonstrando a disposição dos pacientes portadores de LLC (A), LBM clínica (B) e LBM populacional (C) para a análise de comprimento telomérico.

A mediana da razão T/S foi de 0,32 (variando de 0,13 a 0,78), 0,21 (variando de 0,13 a 0,48) e 0,42 (variando de 0,36 a 0,45) para os grupos LLC, LBM clínica e LBM populacional, respectivamente.

Em análise de comprimento telomérico e idade, não encontramos diferença significativa entre os 3 grupos de estudo. Quando comparamos estes com o grupo controle, encontramos que o comprimento telomérico do grupo controle é significativamente maior que o dos 3 grupos de estudo (LLC e LBM clínica com $p < 0,001$ e LBM populacional com $p = 0,007$). Em indivíduos normais, houve redução do comprimento telomérico dos leucócitos do sangue periférico com o avançar da idade, porém, nos 3 grupos analisados, o comprimento telomérico dos linfócitos B

clonais analisados foram igualmente curtos independentemente da idade (Figura 11).

Figura 11. Correlação entre comprimento telomérico de controles saudáveis, portadores de LLC, LBM clínica e LBM populacional em função da idade.

Comprimento telomérico ajustado para a idade foi menor em LLC e em LBM clínica quando comparado aos controles normais ($P < 0,05$). O comprimento telomérico também tendeu a ser menor nos indivíduos com LBM populacional em relação aos controles normais, porém esta diferença não alcançou significância estatística, provavelmente devido ao pequeno número de indivíduos neste grupo (Figura 12).

Figura 12. Comparação de comprimento telomérico ajustado para a idade de leucócitos de sangue periférico e linfócitos B clonais em controles saudáveis, LBM populacional, LBM clínica e LLC.

6 DISCUSSÃO

6.1 miR-155

Corroborando com achados descritos pela primeira vez por Ferrajoli et al, identificamos tendência de hiperexpressão de miR-155 em LBM quando comparado com células B normais e expressão significativamente maior em LLC Binet A ⁸⁶. Estudos anteriores utilizando microarray, RT-qPCR e Northern Blot também demonstraram hiperexpressão deste miRNA em LLC quando comparado a células B normais ^{58; 67; 82; 126; 127}.

Fulci et al. demonstraram aumento da expressão de miR-155 em média 5,3 vezes em LLC quando comparados a controles normais. Este achado ocorreu em praticamente todos os pacientes, o que o fez sugerir que seja uma característica da doença e não um fenômeno de um subgrupo de pacientes ¹²⁷.

Marton et al. compararam a expressão de miRNAs em pacientes com LLC e controles normais utilizando clonagem de pequenos RNAs, Northern Blot e RT-qPCR. Este estudo encontrou o miR-155 como sendo o único com expressão aumentada em LLC ⁵⁸.

Estudo realizado por Pallasch et al. utilizando microarray, encontrou que 7 miRNAs têm expressão aumentada em LLC, dentre eles o miR-155 ¹²⁶. Este mesmo estudo demonstra regulação deste miRNA pelo oncogene PLAG1, que tem expressão aberrante em pacientes com LLC ¹²⁶.

Li et al. estudaram expressão de miRNAs por RT-qPCR em células B normais e em LLC. Estes pesquisadores demonstraram aumento médio de 50 vezes na expressão de miR-155 nas células de LLC comparadas a controles normais e sugeriram que este miRNA possa exercer função de supressor tumoral ⁶⁷.

Vargova et al. também encontraram hiperexpressão de miR-155 em LLC, especialmente nos pacientes que apresentavam hiperexpressão do oncogene MYB associada. Com este achado, eles sugeriram que o MYB possa regular os níveis de miR-155 em LLC ⁸².

É possível que a expressão de miR-155 seja regulada por fatores de transcrição importantes para a evolução da LLC e que este miRNA regule

diretamente genes codificadores envolvidos na transição de LBM para LLC. Considerando-se o exposto acima, inferimos que a desregulação da expressão de miR-155 pode fazer parte de alterações moleculares iniciais que contribuem para a etiopatogênese da LLC.

6.2 miR-34a

Identificamos aumento de expressão de miR-34a em pacientes com LLC quando comparados a controles normais, assim com já havia sido demonstrado por outros pesquisadores^{72; 126} e em estudo realizado anteriormente em nosso serviço¹²⁸. O nível de expressão deste miRNA foi semelhante entre os grupos LLC Binet A e LBM. Não conhecemos outros estudos que tenham mensurado sua expressão em LBM.

Asslaber et al. demonstraram expressão de miR-34a em média 4,6 vezes maior em células de LLC quando comparados a controles sadios. No entanto, a expressão deste miRNA foi altamente variável entre os pacientes. Esta variação foi atribuída ao estado de mutação na p53 ou del17p. A presença destas alterações foram associadas a baixa expressão de miR-34a⁷².

miR-34a é expresso nas células de LLC com o eixo p53 intacto e é hipoexpresso nas células de LLC de pacientes com del17p ou p53 mutado⁷¹. A baixa expressão de miR-34a é associada a resistência a fludarabina, mesmo na ausência de alterações na p53⁷¹.

Em modelos murinos de LLC, durante a fase pré-leucêmica, a expressão de miR-34a é baixa e semelhante a encontrada em controles normais. A expressão deste miRNA aumenta mais de 20 vezes na fase leucêmica⁷². Isto sugere que haja ativação da via da p53 da fase pré-leucêmica para a fase leucêmica da doença.

Dufour et. al demonstraram que o nível de atividade de TP53 em pacientes com LLC tem impacto na progressão da doença e que este nível está significativamente correlacionado com a expressão do miRNA34a¹²⁹. Eles propõem que esta correlação possa ser usada para a individualização de estratégias terapêuticas para a LLC, baseado no padrão de resistência a Fludarabina que o paciente deve apresentar.

6.3 miR-15a e miR-16-1

Demonstramos expressão semelhante de miR15a e miR16-1 nos grupos de LLC e LBM clínica. Ambos os miRNAs têm expressão reduzida nestes grupos com fenótipo anormal, quando comparados ao grupo controle. O primeiro estudo que fez esta comparação entre LLC e células normais foi também o primeiro que descreveu alteração de miRNAs em câncer e demonstrou hipoexpressão desses miRNAs em 65% dos pacientes com LLC ⁴³.

Posteriormente outros estudos confirmaram este achado. Utilizando técnica de microarray, Calin et al. demonstraram redução de miR16-1 em 45% dos pacientes com LLC e de miR-15a em 25% ¹³⁰. Zhu et al., em estudo que comparou pacientes chineses portadores de LLC e indivíduos saudáveis, encontrou redução da expressão de miR15 e miR16-1, especialmente nos portadores de del13q14 ⁵². Sampath et al. demonstraram que 60% dos pacientes portadores de LLC sem deleção 13q14 têm hipoexpressão de miR-15a, este número sobe para 73% em portadores desta deleção. Quando pesquisado o miR-16, estes números foram 52% e 48%, respectivamente ⁵⁵⁵⁵⁵⁵⁵⁵⁵⁵. Desconhecemos a existência de outros estudos que tenham pesquisado a expressão destes miRNAs em LBM.

Outros estudos não identificaram alteração destes miRNAs em LLC. Pallasch et al. utilizaram microarray para encontrar hiperexpressão de 7 miRNAs e hipoexpressão de 19 em pacientes com LLC, sendo sua maioria Bient A ¹²⁶. Os miR-15 e miR-16 não estão entre estes alterados. Utilizando RT-qPCR, Fulci et al. também encontraram expressão semelhante destes miRNAs em pacientes com LLC quando comparados a controles normais ¹²⁷. Allegra et al. demonstraram aumento da expressão dos pri-miRNAs-15a, 16-1 e 16-2 em LLC quando comparado a controles normais, mas a expressão destes mesmos miRNAs maduros estavam reduzidas ¹³¹.

Em estudo com camundongos portadores de deleção em região mínima (MDR) de 13q14, área que contém DLEU2/miR15a/16-1 e camundongos portadores de deleção especificamente na região de miR15a/16-1, Klein et al. demonstraram que deleção do MDR ou dos miR15a/16-1 promove o desenvolvimento de linfócitos clonais em sangue periférico. Aproximadamente 5% de ambos os grupos de

camundongos estudados desenvolveram LBM, 27% dos MDR^{-/-} e 21% dos miR15a/16-1^{-/-} desenvolveram LLC ou Linfoma Linfocítico de Pequenas Células ⁴⁶.

6.4 miR-181a e miR-181b

Identificamos que a expressão tanto de miR181a quanto de miR181b é semelhante em pacientes com LLC e indivíduos com LBM. Pelo nosso conhecimento, é a primeira vez que esta comparação é descrita.

Quando comparamos a expressão destes miRNAs em linfócitos B CD5+ de LLC e de LBM com células B normais, encontramos redução significativa da expressão nas células com fenótipo aberrante. Este achado é semelhante ao de estudos anteriores. Utilizando RT-qPCR, Li et al e Zhu et al. demonstraram hipoexpressão dos miRNAs 181a e 181b em LLC ^{52; 67}. Em análise por Northern Blot, Marton et al descreveram o miR-181a como sendo virtualmente ausente em células de LLC, independentemente do estado de mutação IGHV ⁵⁸. Em pesquisa com microarray, Pallasch et al. encontraram estes miRNAs como sendo hipoexpressos em LLC e consideraram sua falta de sua regulação sobre o oncogene PLAG1 como possível responsável por sua interferência nesta patologia ¹²⁶.

Visone et al demonstraram que o miR181b é um marcador de gravidade e evolução da LLC. Ao pesquisar sua expressão nos mesmos pacientes em momentos distintos, identificou redução significativa a medida que a doença progride e não houve redução nos pacientes com doença estável. Quando comparado com estado de mutação IGHV e expressão de ZAP-70, o miR-181b demonstrou ser o marcador de maior significância para progressão da doença ¹³². Estes mesmos pesquisadores encontraram que a hipoexpressão do miR-181a pode estar associada a casos mais agressivos de LLC com del17p e casos menos agressivos de LLC com trissomia 12 ⁶⁶.

Visone et al sugerem que o nível de expressão do miR-181b seja avaliado no sangue periférico de pacientes com LLC ao longo do tempo, a fim de ser uma potencial maneira de monitorizar pacientes que podem necessitar início breve de quimioterapia ¹³².

6.5 miR-29b

Encontramos expressão semelhante de miR-29b nos 3 grupos. Desconhecemos estudos anteriores que tenham avaliado por RT-qPCR a expressão deste miRNA em portadores de LBM. O achado de expressão semelhante de miR-29b em portadores de LLC e indivíduos saudáveis é discordante de achados de alguns estudos anteriores.

Santanam et al. encontrou expressão 4 vezes maior em LLC indolente e 3,5 vezes maior em LLC agressiva quando comparado a células CD19⁺ normais de cordão umbilical ¹³³. O referido estudo não especifica o que classificaram como doença indolente ou agressiva. A possível inclusão de casos de LLC não Binet A como doença indolente e o fato de a fonte de células CD19⁺ normais ter sido cordão umbilical podem ser responsáveis pela diferença nos resultados encontrados.

Zhu et al., em estudo com pacientes chineses portadores de LLC encontrou hipoexpressão de 5 miRNAs nesta leucemia, dentre eles o miR-29b. Dentre os pacientes de LLC, 40,5% eram Binet A, 31,8% Binet B e 27,5% Binet C ⁵². Esta heterogeneidade no grupo de pacientes pode ser a responsável pela discordância dos resultados.

Sampath et al. também compararam expressão deste miRNA em pacientes com LLC e controles normais. Neste estudo não foi especificado a classificação de Binet dos pacientes ou a agressividade da doença. Corroborando com nosso achado, este grupo descreveu que a expressão de miR-29b é semelhante entre os controles normais e a maior parte dos pacientes de LLC (70%). Dos 30% restantes, metade teve hiperexpressão e outra metade, hipoexpressão ⁵⁵⁵⁵⁵⁵⁵⁵⁵⁵.

Fulci et al. utilizaram RT-qPCR para comparar expressão de miRNAs em pacientes com LLC e células B de controles sadios e células CD5⁺CD19⁺ de cordão umbilical. Assim como no presente estudo, eles não encontraram diferença significativa na expressão de miR-29b entre os grupos estudados ¹²⁷. Nessa pesquisa, o estágio da doença também não é homogêneo no grupo de pacientes com LLC.

Santanam et al. desenvolveram modelos de camundongos transgênicos para miR-29. Praticamente todos os animais desenvolveram população expandida de células CD5⁺CD19⁺ e 20% morreram de leucemia em idade avançada. Este grupo

de pesquisadores concluiu que o aumento da expressão de miR-29 pode iniciar ou pelo menos contribuir significativamente para a patogênese da LLC indolente ¹³³. Acreditamos que devam ser realizados estudos semelhantes distinguindo miR-29a de miR29b para melhor caracterização da importância desta família de miRNAs na patogênese da LLC.

Apenas um outro estudo, realizado em 2013 por Morabito et al., também comparou expressão de miRNAs entre LLC Binet A e LBM clínica. Estes pesquisadores utilizaram microarray e encontraram o miRNA-130a como sendo o único com expressão diferente nestas duas entidades ¹¹. Nesse estudo, foram considerados como casos de LBM clínica pacientes que tiveram o diagnóstico de LLC com os critérios antigos, quando era necessário ter contagem de linfócitos totais maior que 5.000/ μ L, e que deixaram de ter este diagnóstico quando o critério mudou para esta mesma contagem de linfócitos B maduros. Consideramos que isso possa ter criado um importante viés de seleção.

A comparação de alterações genéticas presentes na LLC e na LBM tem o potencial de auxiliar para melhorar o conhecimento sobre a fisiopatologia desta neoplasia. O achado de miRNAs com expressões semelhantes em LLC e LBM e diferentes de controles normais sugere que estas alterações genéticas possam fazer parte de eventos iniciais para duplicação anormal de linfócitos B. O fato de haver miRNA com expressão diferente entre LBM e LLC nos faz inferir que sejam importantes para o desenvolvimento da doença em si. As vias responsáveis por estes eventos ainda não são bem conhecidas. O melhor entendimento destas vias pode propiciar o desenvolvimento de novas terapêuticas.

6.6 Telômeros

Ao pesquisar o comprimento telomérico dos 3 grupos de estudo, não encontramos diferença entre indivíduos portadores de células B CD5+ monoclonais, independentemente do seu diagnóstico. Já quando comparamos com indivíduos normais, corrigindo pela idade, encontramos menor comprimento dos telômeros nos portadores de LBM populacional, LBM clínica e de LLC.

Desconhecemos a existência de estudos que tenham avaliado o comprimento telomérico em portadores de LBM clínica ou populacional. Assim como o nosso, outros estudos encontraram telômeros de comprimento reduzido em pacientes com LLC quando comparados a controles normais.

Hoxha et al. utilizaram qPCR para demonstrar comprimento telomérico significativamente reduzido em LLC, independentemente da idade. Encontraram também que pacientes com IGHV não-mutado tinham telômeros significativamente mais curtos que o grupo com IGHV mutado. Este achado não se repetiu em relação à expressão de CD38 e ZAP-70 ¹⁰³.

Lin et al. demonstraram que o comprimento telomérico diminui conforme o avanço da doença. Portadores de LLC Binet A têm telômeros maiores que pacientes Binet B e os telômeros destes são maiores que os dos portadores de Binet C ¹⁰⁹. Augereau et al. também demonstraram redução telomérica em estágios iniciais da LLC e descrevem que pacientes com doença avançada possuem telômeros criticamente curtos, provavelmente causado por aumento do número de divisões celulares ¹⁰².

Lin et al., em estudo posterior, encontraram que a erosão e disfunção telomérica precedem a evolução clínica da doença e podem predizer quais pacientes com doença Binet A terão bom ou mal prognóstico. Estes pesquisadores concluem que a erosão telomérica deve representar evento precoce na patologia da LLC ⁹⁷.

Sellmann et al. também encontraram redução do comprimento telomérico em células de LLC quando comparado a controles normais. Quando agruparam pacientes baseados em fatores prognóstico, o comprimento telomérico foi significativamente menor naqueles com pior prognóstico ¹⁰⁴. Estes pesquisadores, assim como Brugat et al. afirmam que o comprimento telomérico pode ser usado para predizer prognóstico na LLC ¹¹⁵.

Rossi et al., em estudo realizado em duas universidades italianas com 401 pacientes de LLC, utilizaram Southern Blot para demonstrar redução do comprimento telomérico em pacientes com LLC quando comparado a controles normais, independentemente de idade ou sexo. Estes pesquisadores encontraram que comprimento telomérico $\leq 5000\text{bp}$ está associado a redução na sobrevida livre de tratamento, na sobrevida global e aumento no risco de desenvolvimento de Síndrome de Richter ¹⁰⁰.

Damle et al., utilizando Flow-FISH, também demonstraram que células de LLC têm telômeros reduzidos quando comparados a células B normais, especialmente naqueles pacientes com IGHV não-mutado⁹⁹. Estes pesquisadores não encontraram diferença de sobrevida com relação ao comprimento telomérico ou à atividade da telomerase.

Deve ser considerado que o encurtamento telomérico na LLC causa anomalias no final dos cromossomos, o que é associado a aberrações citogenéticas múltiplas, ambos indicadores de doença agressiva e mal prognóstico na LLC.

7 CONCLUSÕES

A LLC, apesar de ser uma doença muito prevalente e extensamente estudada, ainda não teve seus mecanismos moleculares de iniciação e progressão bem caracterizados. Acreditamos que o melhor detalhamento de alterações moleculares em portadores de LBM seja uma ferramenta importante para o entendimento desta leucemia.

O achado de expressão semelhante dos miRNAs 15a, 16-1, 181a, 181b e 34a em LLC e LBM e diferente de controles normais nos faz concluir que alterações nestes miRNAs são eventos precoces na fisiopatogênese da LLC e contribuem para a expansão clonal de linfócitos B CD5+.

O achado de expressão semelhante de miR-29b em LLC, LBM clínica e controles normais e os diferentes resultados de estudos anteriores expostos acima são intrigantes. Especula-se que a expressão deste miRNA possa variar conforme a evolução da doença, o que poderia explicar os resultados discordantes. Para que isto seja confirmado, são necessários novos estudos com metodologia apropriada para esta comparação.

O único miRNA que demonstrou diferente expressão nos grupos de LLC e LBM foi o miR-155. Com este achado, postula-se que ele possa regular genes responsáveis pela evolução de LBM a LLC, no entanto o mecanismo exato ainda não é bem compreendido.

Diversos pesquisadores demonstraram redução do comprimento telomérico em pacientes com LLC e associaram este achado a fatores prognóstico, conforme descrito anteriormente. Este é o primeiro estudo que avalia o comprimento de telômeros de portadores de LBM clínica e populacional.

Os achados referentes a LBM populacional são limitados devido ao pequeno número indivíduos incluídos e podem servir como incentivo para estudos posteriores com população mais numerosa. O fato de que o comprimento telomérico de portadores de LBM clínica é menor que o da população normal e semelhante ao de pacientes com LLC Binet A sugere que esta alteração faça parte dos eventos iniciais responsáveis pela fisiopatogênese da LLC. A semelhança de comprimento de telômeros associada à observação de que a LBM clínica e a LLC apresentam alterações citogenéticas e estado de mutação IGHV semelhantes¹⁸ reforçam a hipótese que estas duas entidades são estágios de uma mesma doença distinguidos principalmente pela carga tumoral.

REFERÊNCIAS

- 1 Müller-Hermelink, H. K. et al. Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. In: Swerdlow, S. H.; Campo, E., *et al* (Ed.). **WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4th. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. cap. 10, p.180 - 182. (World Health Organization Classification of Tumors).
- 2 Hallek, M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5446-56, Jun 15 2008. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-093906> >.
- 3 Does, G. M. et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. **Br J Haematol**, England, v. 139, n. 5, p. 809-19, 2007. ISSN 1365-2141 (Electronic)0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06856.x> >.
- 4 Falcão, R. P. Leucemia Linfocítica Crônica e Linfocitose B Monoclonal. In: Zago, M. A.; Falcão, R. P., *et al* (Ed.). **Tratado de Hematologia**. 1. São Paulo: Editora Atheneu, v.1, 2014. cap. 47, p.451 - 458.
- 5 Caligaris-Cappio, F.; Ghia, P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? **J Clin Oncol**, v. 26, n. 27, p. 4497-503, Sep 20 2008. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2007.15.4393> >.
- 6 Marti, G. E. et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. **Br J Haematol**, v. 130, n. 3, p. 325-32, Aug 2005. ISSN 0007-1048 (Print)0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x> >.
- 7 Rawstron, A. C. et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. **Blood**, v. 100, n. 2, p. 635-9, Jul 15 2002. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 8 Rawstron, A.C. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 359, n. 6, p. 575-83, Aug 7 2008. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa075290> >.

- 9 D'Arena, G.; Musto, P. Monoclonal B-cell lymphocytosis. **Transl Med UniSa**, v. 8, p. 75-9, Jan 2014. ISSN 2239-9747 (Electronic)2239-9747 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 10 Rawstron, A. C. Monoclonal B cell lymphocytosis--what does it really mean? **Curr Hematol Malig Rep**, v. 8, n. 1, p. 52-9, Mar 2013. ISSN 1558-8211. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11899-012-0144-z> >.
- 11 Morabito, F. et al. Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 21, p. 5890-900, Nov 1 2013. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-0622> >.
- 12 Ghia, P.; Caligaris-Cappio, F. Monoclonal B-cell lymphocytosis: right track or red herring? **Blood**, United States, v. 119, n. 19, p. 4358-62, 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-01-404681> >.
- 13 Landgren, O. et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, United States, v. 360, n. 7, p. 659-67, 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0806122> >.
- 14 Ghia, P. et al. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. **Blood**, United States, v. 103, n. 6, p. 2337-42, 2004. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-09-3277> >.
- 15 Matos, D. M. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis in first-degree relatives of patients with sporadic (non-familial) chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 147, n. 3, p. 339-46, Nov 2009. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07861.x> >.
- 16 Mulligan, C. S.; Thomas, M. E.; Mulligan, S. P. Monoclonal B-lymphocytosis: demographics, nature and subclassification in 414 community patients. **Leuk Lymphoma**, v. 52, n. 12, p. 2293-8, Dec 2011. ISSN 1029-2403 (Electronic)1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2011.598250> >.
- 17 Shanafelt, T. D. et al. Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. **J Clin Oncol**, United States, v. 27, n. 24, p. 3959-63, 2009. ISSN 1527-7755 (Electronic)0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.21.2704> >.

-
- 18 Kern, W. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. **Br J Haematol**, v. 157, n. 1, p. 86-96, Apr 2012. ISSN 1365-2141 (Electronic)0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.09010.x> >.
- 19 Rawstron, A. C. et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2289-90, Oct 1 2002. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-03-0892> >.
- 20 Goldin, L. R. et al. Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. **Br J Haematol**, England, v. 151, n. 2, p. 152-8, 2010. ISSN 1365-2141 (Electronic)0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08339.x> >.
- 21 Linet, M. S. et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. **Br J Haematol**, v. 139, n. 5, p. 672-86, Dec 2007. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06847.x> >.
- 22 Rossi, D. et al. The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. **Br J Haematol**, England, v. 146, n. 1, p. 64-75, 2009. ISSN 1365-2141 (Electronic)0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07711.x> >.
- 23 Rawstron, A. C. Monoclonal B-cell lymphocytosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, United States, p. 430-9, 2009. ISSN 1520-4383 (Electronic)1520-4383 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.430> >.
- 24 Chiorazzi, N.; Rai, K. R.; Ferrarini, M. Chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 352, n. 8, p. 804-15, Feb 24 2005. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra041720> >.
- 25 Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nat Rev Genet**, England, v. 10, n. 10, p. 704-14, 2009. ISSN 1471-0064 (Electronic)1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2634> >.
- 26 Zeng, Y.; Wagner, E. J.; Cullen, B. R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. **Mol Cell**, United States, v. 9, n. 6, p. 1327-33, 2002. ISSN 1097-2765 (Print)1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

-
- 27 Zeng, Y.; Yi, R.; Cullen, B. R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 100, n. 17, p. 9779-84, 2003. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1630797100> >.
- 28 Moussay, E. et al. MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 16, p. 6573-8, Apr 19 2011. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1019557108> >.
- 29 Pasquinelli, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86-9, Nov 2 2000. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35040556> >.
- 30 Bartel, B. MicroRNAs directing siRNA biogenesis. **Nat Struct Mol Biol**, United States, v. 12, n. 7, p. 569-71, 2005. ISSN 1545-9993 (Print)1545-9985 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb0705-569> >.
- 31 Wang, Y.; Lee, C. G. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 1, p. 12-23, Jan 2009. ISSN 1582-1838. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00510.x> >.
- 32 Lee, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, England, v. 23, n. 20, p. 4051-60, 2004. ISSN 0261-4189 (Print)0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385> >.
- 33 Saini, H. K.; Griffiths-Jones, S.; Enright, A. J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 104, n. 45, p. 17719-24, 2007. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0703890104> >.
- 34 Han, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes Dev**, United States, v. 18, n. 24, p. 3016-27, 2004. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1262504> >.
- 35 Yi, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**, United States, v. 17, n. 24, p. 3011-6, 2003. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1158803> >.

-
- 36 Ketting, R. F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes Dev**, v. 15, n. 20, p. 2654-9, Oct 15 2001. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.927801> >.
- 37 Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, United States, v. 115, n. 2, p. 209-16, 2003. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 38 Okamura, K. et al. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. **Genes Dev**, United States, v. 18, n. 14, p. 1655-66, 2004. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1210204> >.
- 39 Doench, J. G.; Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. **Genes Dev**, United States, v. 18, n. 5, p. 504-11, 2004. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1184404> >.
- 40 Chen, B. et al. Roles of microRNA on cancer cell metabolism. **J Transl Med**, v. 10, p. 228, 2012. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-10-228> >.
- 41 Alvarez-Garcia, I.; Miska, E. A. MicroRNA functions in animal development and human disease. **Development**, England, v. 132, n. 21, p. 4653-62, 2005. ISSN 0950-1991 (Print)0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02073> >.
- 42 Balatti, V. et al. miR deregulation in CLL. **Adv Exp Med Biol**, v. 792, p. 309-25, 2013. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-8051-8_14 >.
- 43 Calin, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15524-9, Nov 26 2002. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.242606799> >.
- 44 Cimmino, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 39, p. 13944-9, Sep 27 2005. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506654102> >.

-
- 45 Eis, P. S. et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 102, n. 10, p. 3627-32, 2005. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0500613102> >.
- 46 Klein, U. et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 28-40, Jan 19 2010. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.019> >.
- 47 Fabbri, M. et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Jama**, v. 305, n. 1, p. 59-67, Jan 5 2011. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2010.1919> >.
- 48 Ouillet, P. et al. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. **Cancer Res**, United States, v. 68, n. 4, p. 1012-21, 2008. ISSN 1538-7445 (Electronic)0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-3105> >.
- 49 Cory, S.; Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, England, v. 2, n. 9, p. 647-56, 2002. ISSN 1474-175X (Print)1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc883> >.
- 50 Aqeilan, R. I.; Calin, G. A.; Croce, C. M. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 2, p. 215-20, Feb 2010. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.69> >.
- 51 Hanlon, K.; Rudin, C. E.; Harries, L. W. Investigating the targets of MIR-15a and MIR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7169, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007169> >.
- 52 Zhu, D. X. et al. Aberrant microRNA expression in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Res**, v. 35, n. 6, p. 730-4, Jun 2011. ISSN 0145-2126. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2010.11.005> >.
- 53 Pekarsky, Y.; Croce, C. M. Role of miR-15/16 in CLL. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 1, p. 6-11, Jan 2015. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2014.87> >.

-
- 54 Xu-Monette, Z. Y. et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. **Blood**, v. 119, n. 16, p. 3668-83, Apr 19 2012. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-11-366062> >.
- 55 Sampath, D. et al. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, 16-1, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 119, n. 5, p. 1162-72, Nov 16 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-05-351510> >.
- 56 Calin, G. A. et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 353, n. 17, p. 1793-801, Oct 27 2005. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa050995> >.
- 57 Wang, M. et al. miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. **J Pathol**, v. 215, n. 1, p. 13-20, May 2008. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/path.2333> >.
- 58 Marton, S. et al. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. **Leukemia**, v. 22, n. 2, p. 330-8, Feb 2008. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2405022> >.
- 59 Mraz, M. et al. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. **Leukemia**, England, v. 23, n. 6, p. 1159-63, 2009. ISSN 1476-5551 (Electronic)0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.377> >.
- 60 Calin, G. A. et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 13, p. 5166-71, Apr 1 2008. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0800121105> >.
- 61 Wang, Y. et al. The role of miRNA-29 family in cancer. **Eur J Cell Biol**, v. 92, n. 3, p. 123-8, Mar 2013. ISSN 0171-9335. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.11.004> >.
- 62 Schneider, B. et al. T(3;7)(q27;q32) fuses BCL6 to a non-coding region at FRA7H near miR-29. **Leukemia**, England, v. 22, n. 6, p. 1262-6, 2008. ISSN 1476-5551 (Electronic)0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2405025> >.

-
- 63 Pekarsky, Y. et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. **Cancer Res**, v. 66, n. 24, p. 11590-3, Dec 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3613> >.
- 64 Mott, J. L. et al. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. **Oncogene**, v. 26, n. 42, p. 6133-40, Sep 13 2007. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210436> >.
- 65 Zhao, J. J. et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. **Blood**, United States, v. 115, n. 13, p. 2630-9, 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-09-243147> >.
- 66 Visone, R. et al. Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 114, n. 18, p. 3872-9, Oct 29 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-06-229211> >.
- 67 Li, S. et al. MicroRNA Expression Profiling Identifies Activated B Cell Status in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. **PLoS One**, v. 6, n. 3, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016956> >.
- 68 Hermeking, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 2, p. 193-9, Feb 2010. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.56> >.
- 69 Chen, F.; Hu, S. J. Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 26, n. 2, p. 79-86, Feb 2012. ISSN 1095-6670. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.20412> >.
- 70 Bommer, G. T. et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. **Curr Biol**, England, v. 17, n. 15, p. 1298-307, 2007. ISSN 0960-9822 (Print)0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.068> >.
- 71 Merkel, O. et al. Interdependent regulation of p53 and miR-34a in chronic lymphocytic leukemia. **Cell Cycle**, v. 9, n. 14, p. 2764-8, Jul 15 2010. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

-
- 72 Asslaber, D. et al. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 21, p. 4191-7, May 27 2010. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-07-234823> >.
- 73 Zenz, T. et al. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3801-8, Apr 16 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-08-172254> >.
- 74 Dijkstra, M. K. et al. 17p13/TP53 deletion in B-CLL patients is associated with microRNA-34a downregulation. **Leukemia**, England, v. 23, n. 3, p. 625-7, 2009. ISSN 1476-5551 (Electronic)0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.264> >.
- 75 Rossi, S. et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. **Blood**, United States, v. 116, n. 6, p. 945-52, 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-263889> >.
- 76 Faraoni, I. et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 6, p. 497-505, Jun 2009. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.013> >.
- 77 Tam, W. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. **Gene**, Netherlands, v. 274, n. 1-2, p. 157-67, 2001. ISSN 0378-1119 (Print)0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 78 Elton, T. S. et al. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. **Gene**, v. 532, n. 1, p. 1-12, Dec 10 2013. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.009> >.
- 79 Iorio, M. V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Res**, United States, v. 65, n. 16, p. 7065-70, 2005. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1783> >.
- 80 Yanaihara, N. et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Cell**, United States, v. 9, n. 3, p. 189-98, 2006. ISSN 1535-6108 (Print)1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.025> >.

-
- 81 Metzler, M. et al. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 39, n. 2, p. 167-9, Feb 2004. ISSN 1045-2257 (Print)1045-2257 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.10316> >.
- 82 Vargova, K. et al. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3816-25, Apr 7 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-05-285064> >.
- 83 Dorsett, Y. et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. **Immunity**, United States, v. 28, n. 5, p. 630-8, 2008. ISSN 1097-4180 (Electronic)1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.002> >.
- 84 Mraz, M.; Kipps, T. J. MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 54, n. 8, p. 1836-9, Aug 2013. ISSN 1026-8022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2013.796055> >.
- 85 Cui, B. et al. MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 124, n. 4, p. 546-54, Jul 24 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-03-559690> >.
- 86 Ferrajoli, A. et al. Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 122, n. 11, p. 1891-9, Sep 12 2013. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-01-478222> >.
- 87 Lin, S. et al. Prognostic role of microRNA-181a/b in hematological malignancies: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59532, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059532> >.
- 88 Chen, C. Z. et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. **Science**, United States, v. 303, n. 5654, p. 83-6, 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic)0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1091903> >.
- 89 Zhu, D. X. et al. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 7, p. 1294-301, Jul 2012. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgs179> >.

-
- 90 Sivina, M. et al. Stromal cells modulate TCL1 expression, interacting AP-1 components and TCL1-targeting micro-RNAs in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 26, n. 8, p. 1812-20, Aug 2012. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.63> >.
- 91 Bichi, R. et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 99, n. 10, p. 6955-60, 2002. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.102181599> >.
- 92 Moussay, E. et al. Determination of genes and microRNAs involved in the resistance to fludarabine in vivo in chronic lymphocytic leukemia. **Mol Cancer**, England, v. 9, p. 115, 2010. ISSN 1476-4598 (Electronic)1476-4598 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-9-115> >.
- 93 Calado, R. T.; Young, N. S. Telomere diseases. **N Engl J Med**, v. 361, n. 24, p. 2353-65, Dec 10 2009. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0903373> >.
- 94 Moyzis, R. K. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 18, p. 6622-6, Sep 1988. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 95 Palm, W.; de Lange, T. How shelterin protects mammalian telomeres. **Annu Rev Genet**, v. 42, p. 301-34, 2008. ISSN 0066-4197 (Print)0066-4197 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350> >.
- 96 Verfaillie, C. M.; Pera, M. F.; Lansdorp, P. M. Stem cells: hype and reality. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 369-91, 2002. ISSN 1520-4391 (Print)1520-4383 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 97 Lin, T. T. et al. Telomere dysfunction accurately predicts clinical outcome in chronic lymphocytic leukaemia, even in patients with early stage disease. **Br J Haematol**, Jul 3 2014. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13023> >.
- 98 Gertler, R. et al. Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. **J Clin Oncol**, United States, v. 22, n. 10, p. 1807-14, 2004. ISSN 0732-183X (Print)0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2004.09.160> >.

-
- 99 Damle, R. N. et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. **Blood**, United States, v. 103, n. 2, p. 375-82, 2004. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-04-1345> >.
- 100 Rossi, D. et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, England, v. 23, n. 6, p. 1062-72, 2009. ISSN 1476-5551 (Electronic)0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.399> >.
- 101 Poncet, D. et al. Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, United States, v. 111, n. 4, p. 2388-91, 2008. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-09-111245> >.
- 102 Augereau, A. et al. Telomeric damage in early stage of chronic lymphocytic leukemia correlates with shelterin dysregulation. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1316-22, Aug 4 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-07-295774> >.
- 103 Hoxha, M. et al. Relevance of telomere/telomerase system impairment in early stage chronic lymphocytic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 53, n. 7, p. 612-21, Jul 2014. ISSN 1045-2257. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.22171> >.
- 104 Sellmann, L. et al. Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. **Int J Hematol**, v. 93, n. 1, p. 74-82, Jan 2011. ISSN 0925-5710. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-010-0750-2> >.
- 105 Roos, G. et al. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, United States, v. 111, n. 4, p. 2246-52, 2008. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-05-092759> >.
- 106 Bechter, O. E. et al. Telomere length and telomerase activity predict survival in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Res**, v. 58, n. 21, p. 4918-22, Nov 1 1998. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

-
- 107 Mansouri, L. et al. Short telomere length is associated with NOTCH1/SF3B1/TP53 aberrations and poor outcome in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia patients. **Am J Hematol**, v. 88, n. 8, p. 647-51, Aug 2013. ISSN 0361-8609. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23466> >.
- 108 Rampazzo, E. et al. Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. **Haematologica**, v. 97, n. 1, p. 56-63, Jan 2012. ISSN 0390-6078. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.049874> >.
- 109 Lin, T. T. et al. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. **Blood**, v. 116, n. 11, p. 1899-907, Sep 16 2010. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-02-272104> >.
- 110 Palma, M. et al. Telomere length and expression of human telomerase reverse transcriptase splice variants in chronic lymphocytic leukemia. **Exp Hematol**, v. 41, n. 7, p. 615-26, Jul 2013. ISSN 0301-472x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2013.03.008> >.
- 111 Ricca, I. et al. Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. **Leukemia**, England, v. 21, n. 4, p. 697-705, 2007. ISSN 0887-6924 (Print)0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404544> >.
- 112 Grabowski, P. et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. **Blood**, United States, v. 105, n. 12, p. 4807-12, 2005. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-11-4394> >.
- 113 Hultdin, M. et al. Association between telomere length and V(H) gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia: clinical and biological implications. **Br J Cancer**, England, v. 88, n. 4, p. 593-8, 2003. ISSN 0007-0920 (Print)0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6600763> >.
- 114 Ishibe, N. et al. Telomere length and heavy-chain mutation status in familial chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Res**, England, v. 26, n. 9, p. 791-4, 2002. ISSN 0145-2126 (Print)0145-2126 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

-
- 115 Brugat, T. et al. Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal aberrations in resistant chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, United States, v. 116, n. 2, p. 239-49, 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-12-257618> >.
- 116 Rossi, D. et al. Low CD49d expression and long telomere identify a chronic lymphocytic leukemia subset with highly favourable outcome. **Am J Hematol**, v. 85, n. 8, p. 619-22, Aug 2010. ISSN 1096-8652 (Electronic)0361-8609 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21756> >.
- 117 Binet, J. L. et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer**, v. 48, n. 1, p. 198-206, Jul 1 1981. ISSN 0008-543X (Print)0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 118 Matos, D. M. **Linfocitose B Monoclonal em familiares de primeiro grau de pacientes com o diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crônica esporádica (não-familiar)**. 2009. 127 (Doutorado). Clínica Médica, Universidade de São Paulo
- 119 Matutes, E. et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. **Leukemia**, v. 8, n. 10, p. 1640-5, Oct 1994. ISSN 0887-6924 (Print)0887-6924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 120 Moreau, E. J. et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). **Am J Clin Pathol**, v. 108, n. 4, p. 378-82, Oct 1997. ISSN 0002-9173 (Print)0002-9173. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 121 Basu, S. et al. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). **J Vis Exp**, n. 41, 2010. ISSN 1940-087x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3791/1546> >.
- 122 Chen, C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 20, p. e179, 2005. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gni178> >.
- 123 Schmittgen, T. D. et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. **Methods**, v. 44, n. 1, p. 31-8, Jan 2008. ISSN 1046-2023 (Print)1095-9130 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.006> >.

-
- 124 Cawthon, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 10, p. e47, May 15 2002. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 125 Scatena, N. F. **Avaliação de disfunção telomérica em pacientes com carcinoma hepatocelular secundário à cirrose hepática**. 2014. 90 (Master). Genetic Department, University of Sao Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto.
- 126 Pallasch, C. P. et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 114, n. 15, p. 3255-64, Oct 8 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-06-229898> >.
- 127 Fulci, V. et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4944-51, Jun 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-12-062398> >.
- 128 Zanette, D. L. et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 11, p. 1435-40, Nov 2007. ISSN 0100-879x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 129 Dufour, A. et al. Inactivation of TP53 correlates with disease progression and low miR-34a expression in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients. **Blood**, v. 121, n. 18, p. 3650-7, May 2 2013. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-10-458695> >.
- 130 Calin, G. A. et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 101, n. 32, p. 11755-60, 2004. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404432101> >.
- 131 Allegra, D. et al. Defective DROSHA processing contributes to downregulation of MiR-15/-16 in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, England, v. 28, n. 1, p. 98-107, 2014. ISSN 1476-5551 (Electronic)0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.246> >.
- 132 Visone, R. et al. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 118, n. 11, p. 3072-9, Sep 15 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-01-333484> >.
- 133 Santanam, U. et al. Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 27, p. 12210-5, Jul 6 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1007186107> >.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Comparação entre o comprimento de telômeros e composição de micro RNA de linfócitos CD5+ CD19+ de indivíduos com Linfocitose B Monoclonal e pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica Binet A.”

Pesquisadores responsáveis: Felipe Magalhães Furtado e Roberto Passetto Falcão

Contato: (16) 3602-2610 / (16) 8822-7889 felipemf@usp.br

CONVITE PARA PARTICIPAR DA PESQUISA

Por meio deste termo os pesquisadores Felipe Magalhães Furtado e Roberto Passetto Falcão convidam o senhor(a) a participar de um estudo que pretende melhorar o conhecimento médico/científico sobre a Leucemia Linfóide Crônica e a Linfocitose B Monoclonal.

O que se quer estudar?

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é um tipo de neoplasia causada por células do sangue chamadas de linfócitos B. As pessoas portadoras desta neoplasia têm um grande número de células doentes no sangue e devem fazer seguimento médico regular para verificar o momento de iniciar o tratamento.

A Linfocitose B Monoclonal (LBM) é uma alteração na qual a pessoa também possui linfócitos B doentes, semelhantes aos da LLC, porém estas células não se proliferam como as

células doentes da LLC. As pessoas portadoras de LBM podem ter quantidade normal ou um pouco aumentada de linfócitos no seu sangue e elas não precisam de tratamento.

Nesta pesquisa queremos estudar pessoas com estes dois tipos de alteração sanguínea para tentar identificar alterações nessas células que possam justificar algumas pessoas terem doença (LLC) e outras não (LBM), apesar de terem células parecidas no sangue.

Como será realizado o estudo?

- 1) Portador de LLC - Coleta de sangue: serão coletadas, de veias localizadas em um de seus braços, 2 amostras de sangue de 5 mL cada, ou seja, aproximadamente 1 colher de chá em cada coleta. Estas coletas serão realizadas nas datas do seu retorno para consulta no ambulatório de hematologia. Você poderá sentir um desconforto no momento da retirada do sangue e pode formar uma mancha roxa no local (hematoma), mas o profissional que realizará esse procedimento é qualificado, experiente e seguirá todas as etapas de segurança, utilizando material totalmente descartável. Seu sangue será encaminhado para o laboratório do hospital para avaliação das células doentes.
- 2) Portador de LBM - Coleta de sangue: serão coletadas, de veias localizadas em um de seus braços, 2 amostras de sangue de 24 mL cada, ou seja, aproximadamente 5 colheres de chá em cada coleta. Estas coletas serão realizadas nas datas do seu retorno para consulta no ambulatório de hematologia. Você poderá sentir um desconforto no momento da retirada do sangue e pode formar uma mancha roxa no local (hematoma), mas o profissional que realizará esse procedimento é qualificado, experiente e seguirá todas as etapas de segurança, utilizando material totalmente descartável. Seu sangue será encaminhado para o laboratório do hospital para avaliação das células doentes.

O estudo trará algum custo para minha família?

Pela sua participação no estudo, você não irá receber ou fornecer qualquer valor em dinheiro. Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

O atendimento médico da pesquisa e a coleta de sangue serão realizados no dia da sua consulta no ambulatório de hematologia do Hospital das Clínicas.

Quem saberá dos resultados deste estudo?

Os seus dados durante o estudo são confidenciais de acordo com o Código de Ética. Você será identificado por números e as informações pessoais não serão liberadas sem a sua autorização por escrito. Você não será identificado pessoalmente em nenhuma publicação sobre o assunto.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento.

Quais os benefícios deste estudo?

Este estudo pode não trazer benefícios diretos a você, mas ele permitirá um maior entendimento da Leucemia Linfóide Crônica, um tipo de neoplasia que não se conhece exatamente como ela se desenvolve.

Problemas ou perguntas

Se você tiver alguma pergunta sobre este estudo ou no caso de qualquer problema relacionado à pesquisa entre em contato com Dr. Felipe Magalhães Furtado pelos telefones: (16) 3602-2610/ 8822-7889.

Assinaturas

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido ou se ele tiver sido explicado para você e tiver entendido a informação e concorde voluntariamente em participar deste estudo, por favor, assine abaixo:

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 201__

Nome do participante: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura do participante

Assinatura da testemunha

Eu expliquei o propósito deste estudo ao voluntário e estou certo de que ele (ela) entendeu o motivo, os procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

Nome do pesquisador: Felipe Magalhães Furtado

Assinatura do pesquisador _____ Data__/__/__

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, telefone: (16) 3602-2228.

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa local

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO ENTRE O COMPRIMENTO DE TELÔMEROS E A COMPOSIÇÃO DE MICRO RNA DE LINFÓCITOS CD5+ CD19+ DE INDIVÍDUOS COM LINFOCITOSE B MONOCLONAL E PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA BINET A.

Pesquisador: FELIPE MAGALHÃES FURTADO

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 17823413.7.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 519.646

Data da Relatoria: 09/12/2013

Apresentação do Projeto:

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é a neoplasia hematológica mais comum no mundo ocidental; LLC tem uma apresentação clínica muito variável incluindo desde pacientes assintomáticos, até pacientes com citopenias graves e rápida evolução. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos em citometria de fluxo, tem-se identificado indivíduos assintomáticos que apresentam linfócitos B monoclonais em sangue periférico, com fenótipo semelhante aos linfócitos de LLC. Atualmente, os dados são limitados para definir fatores prognósticos em LLC e para explicar a razão da heterogeneidade da sua apresentação clínica. Existem indícios de que o comprimento do telômero dos linfócitos leucêmicos, a composição de microRNA e alterações citogenéticas podem estar envolvidos. Objetivos: Identificar e comparar o comprimento dos telômeros, composição de microRNA e alterações citogenéticas entre pacientes portadores de Linfocitose B Monoclonal e Leucemia Linfocítica Crônica Binet A. Metodologia: Do sangue periférico de pacientes com LLC Binet A e em indivíduos com LBM que são acompanhados no ambulatório de hematologia do HCRP, serão purificados os linfócitos B CD19+CD5+ em um γ cell sorter γ JSAN (Bay Bioscience, Japão). A partir deste material, será analisado o comprimento dos telômeros por PCR

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 519.646

em tempo real, realizada a quantificação de miR-15a, miR-16-1, miR-29b, miR-181a e miR-181b por RTPCR em tempo real, pesquisado alterações citogenéticas (+12, deleções/ rearranjos 6q22 (MYB), deleções de 11q22.3 (ATM), 13q14(D13S319) e deleções de 17p13 (TP53)) e comparados os resultados de ambos os grupos.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar e comparar alterações citogenéticas, comprimento dos telômeros e a composição de micro RNA entre pacientes portadores de Linfocitose B Monoclonal e Leucemia Linfocítica Crônica Binet A.

Objetivos específicos:

- 1- Identificar o comprimento dos telômeros dos linfócitos B por PCR nos pacientes com LLC Binet A e LBM e comparar os resultados encontrados em ambos os grupos;
- 2- Identificar a composição de micro RNA em pacientes com LLC Binet A e LBM por RT PCR em tempo real e comparar os resultados encontrados em ambos os grupos.
- 3- Identificar e comparar a frequência de alterações citogenéticas através da técnica de FISH em linfócitos B de pacientes com LLC Binet A e LBM.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A única interação com os pacientes do projeto será nos momentos das coletas de sangue. Estas coletas serão realizadas nos dias de suas consultas no ambulatório de hematologia do HCRP, no momento da coleta de exames solicitados durante a consulta.

O presente projeto visa a compreender alterações moleculares que justifiquem o desenvolvimento de LLC, não trará nenhum benefício direto aos pacientes a não ser pelo maior conhecimento desta patologia.

Os riscos que este projeto pode acarretar aos pacientes participantes são os riscos inerentes a coleta de amostra sanguínea em veia periférica, que são desconforto no momento da coleta e, em alguns casos, formação de hematoma no local da coleta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto visa identificar e comparar o comprimento dos telômeros, composição de microRNA e alterações citogenéticas entre pacientes portadores de Linfocitose B Monoclonal e Leucemia Linfocítica Crônica Binet A para tentar identificar alterações nas células que possam justificar algumas pessoas terem doença (LLC) e outras não (LBM), apesar de terem células parecidas no

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 519.646

sangue.

A única interação com os pacientes será retirar duas amostras de 5 mL cada de sangue periférico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi incluído um orçamento detalhado e um TCLE.

Recomendações:

As alterações/esclarecimentos solicitados no parecer anterior foram devidamente providenciados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP considera aprovado o Projeto de Pesquisa Versão 02 datado de 03/12/13, assim como o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Versão 02. Data: 03/12/2013.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 03 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO C – Artigo científico

MicroRNA expression and telomere length dynamics in Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia Binet A

Abstract

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most common leukemia on Western countries, it has an heterogeneous clinical presentation and outcome. Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) may precede all CLL cases. The molecular mechanisms responsible for this evolution are not known. Aberrant miRNA expression and telomere shortening may contribute for the pathophysiology of this disease. The objective of this study was to identify differences on telomere length and miRNA expression between CLL patients, subjects with clinical and population-screening MBL and healthy volunteers. 21 CLL patients, 11 subjects with clinical MBL, 6 with population-screening MBL and 10 healthy volunteers were enrolled on this study. As control for telomere length, we used a group of 261 healthy volunteers aged 0 to 86 years old that had been enrolled on a previous study from our group. After diagnosis confirmation, it has been done a flow cytometry CD19+CD5+ cell sorting for the study groups and CD19+ cell sorting for the control group. The expression of the miRNAs 15a, 16-1, 29b, 34a, 155, 181a and 181b was determined by RT-qPCR. The telomere length was determined by qPCR. miR-155 was the only one with different expression between the CLL and MBL groups, presenting higher expression on the CLL group. This miRNA and the miR-34a are overexpressed on the study groups when compared to the control group, although this difference did not reach statistical significance when the miR-155 expression in MBL is considered. miRNAs 15a, 16-1, 181a and 181b are underexpressed on the study groups. The miR-29b was the only one with similar expression on all groups. The telomere length was similar on the 3 study groups and shorter on these groups when compared to normal subjects. The expression of miR-155 is different in CLL and MBL, it may contribute for this evolution. Aberrant expression of miR 34a, 15a, 16-1, 181a and 181b may contribute for the clonal expansion of CD5+ B lymphocytes. The role of miR-29b on the CLL pathogenesis and evolution is still not understood. The reduced telomere length on CLL and MBL may be part of the initial events of this leukemia pathogenesis.

Key-Words: Monoclonal B-Cell Lymphocytosis, Chronic Lymphocytic Leukemia, microRNA, telomeres.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a neoplasm characterized by an excess of monoclonal B lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow, spleen and lymph nodes ¹. It is the most common leukemia in the western world. Its annual incidence is 5.1 cases/100,000 person, is more frequent in males and its incidence increases with age ².

The cellular immunophenotype CD19, CD5 and CD23 positive and low or negative expression of CD20, FMC7 and surface immunoglobulin is characteristic of this disease ^{3; 4}. Over the last years, advances in flow cytometry technique has provided the identification of small population of monoclonal lymphocytes with this immunophenotype typical of CLL. This is found in 0,6% to 12% of the population ^{5; 6; 7} and is called Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) ³.

MBL may be subdivided in clinical and population-screening MBL. The first one is usually diagnosed in asymptomatic subjects with mild lymphocytosis; the latter occurs in asymptomatic subjects with normal blood counts that has been submitted to flow cytometry screening ^{8; 9; 10}.

As occurs in CLL, MBL is more frequent in men, specially in relatives of CLL patients ^{11; 12; 13} and its frequency increases with age ^{5; 12; 14; 15; 16; 17}. There is an hypothesis that all CLL cases may be preceded by MBL ¹⁸.

MicroRNAs are 19 to 25 nucleotides single strand RNAs responsible for gene expression and cellular metabolism regulation ^{19; 20}. Alterations in miRNA expression has been associated to solid and hematologic tumors ¹⁹. Some microRNAs have been shown to be abnormally expressed in CLL ²¹.

Telomeres are the ends of linear chromosomes composed of tandem hexameric nucleotide repeats of 5-TTAGGG-3, coated by the shelterin proteins ²². They have the function to protect the chromosomes and are reduced in every cell cycle due to the inability of the DNA polymerase to replicate the chromosome's 3' ends ²³.

Telomeric erosions may interfere with its function to protect the chromosomes, causing genetic instability ²⁴. It may have an important role in common human tumors, like CLL ^{24; 25; 26}.

The study of molecular and genetic basis of MBL may help to elucidate initial points of CLL's pathophysiology. Only a few studies have investigated miRNAs in MBL ^{9; 27}. As far as we are concerned, telomere length has never been investigated in this entity before. In this study, on the basis of the important role of miRNAs and telomere length on CLL and other tumors, we hypothesized that abnormality in some miRNAs expression and telomere shortening may be present in MBL and have a role in the initial monoclonal B-cell expansion.

Materials and methods

Cell samples from normal individuals, individuals with population-screening MBL, clinical MBL and patients with CLL.

We analyzed samples from 6 individuals with population-screening MBL, 11 with clinical MBL and 21 patients with CLL Binet A who are followed on the University Hospital of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Ten healthy individuals were used as a control group for the miRNAs experiments. For telomere length analysis, our controls

were data from 261 healthy volunteers aged 0 to 86 years enrolled in another research from our group ²⁸. This study was reviewed and approved by the Institution's Ethics Research Reviewed Board and written informed consent was obtained from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki.

CD5+ B-cells were purified from blood samples of individuals from the three study groups and all B-cells from the miRNAs control group, using cell sorting by flow cytometry, as previously described ²⁹. Post preparation purity, as assessed by flow cytometry (available on 37/48 (77%) volunteers) indicated that the isolated cells were predominantly (86%) the desired cells. Clinical characteristics of the enrolled subjects are summarized on table 1.

Table 1. Characteristics of the enrolled subjects.

Charactetistics	Control	population-screening MBL	Clinic MBL	CLL
Number of Subjects	10	6	12	21
Medium age	38,6	69	77,83	69,71
range (years)	25 - 60	53 - 82	57 - 97	58 - 81
Gender				
Male	2	5	9	11
Female	8	1	3	10
Medium number of lymphocytes	2.064	1.466	3.933	41.714
range (/μL)	1.360 - 3.300	800 - 2100	2.900 - 5.900	7.500 - 147.000
% CD5+ B-Lymphocytes				
in total lymphocytes	-	1,68	34,9	78,02
range (%)	-	0,72 - 3,43	5,97 - 61,01	58,63 - 91,09

RNA isolation and miRNA expression analysis

RNA was extracted with Trizol (Life Technologies), using CD5+ B cells isolated from de study groups and B cells from the control group. Seven miRNAs known to have abnormal expression in CLL were selected for analysis (miR-15a, miR-16-1, miR-29b, miR-34a, miR-181a, miR-181b and miR-155). miRNA expression was measured with the TaqMan miRNA quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction as previously described ^{30; 31}. Briefly, 5ng of total RNA was reverse transcribed using the microRNA reverse-transcription kit (Applied Bio-systems) and a reverse transcription specific stem-loop primer. RT-qPCR analysis was performed using the gene-specific Taqman assay (primers and probes; Applied Bio-systems). Expression levels for nucleolar RNAs RNU24, RNU44 and RNU48 were similar for all groups and samples were normalized for the geometric mean of these 3 RNA's expression, as described previously ³².

The expression of a miRNA relative to the geometric mean of the endogenous controls was determined using $2^{-\Delta Ct}$ method. The coefficient of variation (CV) of the reactions were calculated. If the CV of a reaction was more than 2% in two successive experiments, the specific values were considered to be unavailable. All the miRNAs were studied in duplicate.

DNA isolation and telomere length analysis

DNA was extracted from the isolated CD5+ B cells of the 3 study groups with the Gentra Puregene Blood® kit (Qiagen), according to the manufacture's protocol. Telomere length was determined by real time polymerase chain reaction (PCR), as previously described ³³ and values were expressed as telomere/single copy gene

(T/S) ratio. Briefly, two separate PCR runs were performed for each sample, the first to determine the cycle threshold (Ct) value for telomere amplification, and the second to determine the Ct value for control gene amplification. A standard curve was generated in each run, consisting of reference DNA diluted serially. Both reference and sample DNA were analyzed in triplicate (16ng DNA/aliquot).

The Ct values generated in both runs were used to calculate relative T/S values for each sample: $T/S = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. CV less than 2% was accepted for the telomere reactions and less than 1% for the single gene reactions. All samples were studied in triplicate.

Statistical analysis

For the miRNAs statistical analysis, the Kolmogorov-Smirnov normality test was initially performed. For the miRNAs 15a, 16-1, 29b, 181b and 155, which did not reject the normality hypothesis, the variance analysis (ANOVA) method was performed and the Bonferroni *post hoc* test was also performed when the difference reached statistical significance. For the miRNAs 34a and 181a, which rejected the normality hypothesis, the Kruskal-Wallis non-parametric test was performed (non-parametric ANOVA) and when the difference reached statistical significance, the Dunn *post hoc* test was performed.

For analysis of telomere length and age, the Covariance test (ANCOVA) was performed to compare all four groups. To analyze age-adjusted telomere length, non-parametric Kruskal-Wallis and the confirmatory Dunn test were used.

All tests were considered statistically significant at the .05 level.

Results

miRNAs expression

A total of 49 subjects were enrolled on this study, 21 on the CLL group, 12 on the clinical MBL group, 6 on the population-screening MBL group and 10 on the control group. All the population-screening MBL samples were excluded from the miRNAs analysis due to RT-qPCR quality control issues.

miRNA-155 is the only one differently expressed in CLL and clinical MBL, with a higher expression in CLL ($p = 0.002$). This difference is even greater when CLL is compared to normal controls ($p < 0.001$). Its expression in clinical MBL has a tendency to be greater than in normal subjects, but this difference did not reach statistical significance, maybe due to the small amount of samples studied (Figure 2).

Likewise miR-155, miR-34a is overexpressed in cell with abnormal phenotype when compared to normal controls ($p = 0.003$ for clinical MBL and $p = 0.02$ for CLL). Its expression in MBL and CLL is similar (Figure 2).

miRNAs 15a, 16-1, 181a and 181b are down-regulated in cells with abnormal phenotype. Their expression is lower in CLL patients when compared to controls ($p < 0.001$ for all miRNAs). Clinical MBL subjects also have lower expression than controls ($p < 0.001$ for miRNAs 15a, 16-1 and 181b and $p = 0.003$ for miRNA 181a) (Figure 2).

The expression of miRNA-29b resulted similar on the three groups (Figure 2).

Figure 2. microRNA expression on Control, MBL and CLL groups. A) miR-155; B) miR-34a; C) miR-15a; D) miR-16-1; E) miR-181a; F) miR-181b; G) miR-29b.

Table 2. miRNAs 155, 34a, 15a, 16-1, 181a, 181b and 29b expression on the Control group, MBL subjects and CLL patients.

		Control	MBL	CLL	p
miR.155	Subjects)studied	10	12	21	/
	Minimum)expression	0,13	0,16	0,12	/
	Maximum)expression	0,37	1,29	2,97	/
	Mean)expression	0,25	0,58	1,26	/
	Standard)deviation	0,08	0,33	1,59	/
	Control)X)MBL	/	/	/	
	Control)X)CLL	/	/	/	<)0,001
	MBL)X)CLL	/	/	/	0,002
miR.34a	Subjects)studied	8	12	20	/
	Minimum)expression	0,41	0,96	0,65	/
	Maximum)expression	2,89	104,10	7,85	/
	Mean)expression	1,38	11,02	4,56	/
	Standard)deviation	0,86	28,88	2,12	/
	Control)X)MBL	/	/	/	0,003
	Control)X)CLL	/	/	/	0,02
	MBL)X)CLL	/	/	/	
miR.15a	Subjects)studied	10	12	21	/
	Minimum)expression	2,27	0,13	0,04	/
	Maximum)expression	5,59	2,93	3,58	/
	Mean)expression	3,84	1,33	1,24	/
	Standard)deviation	0,992	0,92	1,02	/
	Control)X)MBL	/	/	/	<)0,001
	Control)X)CLL	/	/	/	<)0,001
	MBL)X)CLL	/	/	/	
miR.16.1	Subjects)studied	9	9	17	/
	Minimum)expression	42,30	2,73	1,80	/
	Maximum)expression	74,27	32,11	58,66	/
	Mean)expression	49,24	14,47	15,19	/
	Standard)deviation	10,00	8,49	14,35	/
	Control)X)MBL	/	/	/	<)0,001
	Control)X)CLL	/	/	/	<)0,001
	MBL)X)CLL	/	/	/	
miR.181a	Subjects)studied	10	12	20	/
	Minimum)expression	17,36	1,37	0,19	/
	Maximum)expression	53,98	23,53	16,13	/
	Mean)expression	30,68	3,53	2,77	/
	Standard)deviation	11,68	6,03	4,32	/
	Control)X)MBL	/	/	/	0,003
	Control)X)CLL	/	/	/	<)0,001
	MBL)X)CLL	/	/	/	

	Control	MBL	CLL	p
miR.181b				
Subjects)studied	9	11	20	/
Minimum)expression	137,05	22,89	14,62	/
Maximum)expression	1001,14	413,90	276,51	/
Mean)expression	332,15	93,11	73,92	/
Standard)deviation	321,39	108,68	75,98	/
Control)X)MBL	/	/	/	<)0,001
Control)X)CLL	/	/	/	<)0,001
MBL)X)CLL	/	/	/	
miR.29b				
Subjects)studied	10	12	21	/
Minimum)expression	3,57	0,48	0,36	/
Maximum)expression	7,47	9,01	7,85	/
Mean)expression	4,24	2,12	4,56	/
Standard)deviation	1,38	2,45	2,12	/
Control)X)MBL	/	/	/	
Control)X)CLL	/	/	/	
MBL)X)CLL	/	/	/	

Telomere length

Median telomere length (TL) was 0.32 (range, 0.13 to 0.78), 0.21 (range, 0.13 to 0.48) and 0.42 (range, 0.36 to 0.45) for CLL, clinic MBL and population-screening MBL, respectively.

TL related to age was similar for the three study groups. When compared to healthy controls, telomere of individuals with abnormal phenotype is significantly smaller than the telomere of the normal subjects (CLL and clinical MBL $p < 0.001$ and population-screening MBL $p = 0.007$). In healthy individuals, TL of peripheral blood leukocytes shortened with aging, but in the three patient groups analyzed, clonal B-cells TLs were equally short regardless of patient's age (Figure 4).

Figure 4. Telomere length in normal controls, population-screening MBL, clinical MBL and CLL patients.

Age-adjusted TL was shorter in CLL and clinic MBL as compared to healthy controls ($P < 0.05$; Figure). TL also tended to be shorter in population-screening MBL in comparison to healthy subjects, although not reaching statistic significance probably due to the low number of individuals in this group (Figure 5).

Figure 5. Peripheral blood leukocyte and clonal B-cell telomere length age adjusted in healthy controls, population-screening MBL (psMBL), clinic MBL (cMBL) and Binet A CLL patients.

Discussion

Various studies using different methodologies have identified overexpression of miR-155 in CLL when compared do normal controls^{27; 34; 35; 36; 37; 38}. Only one other study has measured the expression of this miRNA in MBL²⁷. Similar to our results, Ferrajoli et al. found the expression of miR-155 greater in CLL Binet A than in clinical MBL and that its expression in these individuals is greater than in normal controls.

The regulation of miR-155 and its target genes in CLL are not well understood. It is possible that its expression is regulated for transcription factors that have an important rule in CLL evolution and that this miRNA directly regulate codifying genes important for the transition of MBL to CLL.

As shown before for our other groups, we identified miR-34a to be overexpressed in CLL when compared to normal controls^{36; 39; 40}. This miRNA expression has been associated to the regulation of the TP53 pathway^{39; 41; 42; 43; 44} and may be associated to fludarabine resistance in CLL⁴².

The study that first demonstrated down-regulation of miR-15a and 16-1 in CLL patients was also the first to demonstrate abnormal expression of miRNAs in cancer⁴⁵. Subsequent studies using different techniques have confirmed this finding specially in patients that have del13q14^{46; 47; 48}. Other authors found similar expression of these miRNAs in CLL and normal controls, using microarray³⁶ and RT-qPCR³⁴. Klein et al. demonstrated that mouse models that have the chromosome area responsible for these miRNAs transcription (13q14) deleted develop monoclonal lymphocytes expansion on blood⁴⁹.

We found miRNAs 181a and 181b to be down-regulated in CLL when compared to normal controls. Other authors had the same results in studies using RT-qPCR^{37; 47}, Northern Blot³⁵ and microarray³⁶. Visone et al. demonstrated that the down-regulation of miR-181b is a better marker of worse prognosis in CLL than

IGHV mutation status and ZAP-70 expression and suggested that its expression should be followed in CLL patients⁵⁰.

The miR-29b expression level pattern in CLL is not well understood. We found it to be similar in CLL Binet A, clinical MBL and normal controls. Sampath et al. found that 70% of the CLL patients have similar expression to normal controls⁴⁸. Fulci et al. also had results similar to ours³⁴. Other authors had different results. Santanam et al. found this miRNA to be overexpressed in CLL, yet Zhu et al. found it to be down regulated in CLL. All these studies have heterogeneous groups of CLL patients regarding the stage of the disease. These different results may suggest that miR-29b expression may change according to the disease stage, this should be confirmed in future studies.

Apart from the study of Ferrajoli et al. with miR-155 cited before, only one other author have evaluated miRNAs expression in clinical MBL. Morabito et al. used microarray to study a group of individuals previously diagnosed with CLL before the change in diagnosis criteria proposed by the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia in 2008^{9; 51}. They found miR-130a as the only one with different expression in CLL and clinical MBL. The fact that all MBL individuals have a high lymphocyte count close to the CLL diagnosis criteria may be an important bias to this study. Using another technique and a more heterogeneous clinical MBL group, we found the expression of the miRNAs 34a, 15a, 16-1, 181a, 181b and 29b to be similar in CLL and clinical MBL.

As far as we know, this is the first study to investigate telomere length in clinical and population-screening MBL and we found it to be similar in these two entities and in CLL and smaller than in general population, although our samples of population-screening MBL is small and this result should be confirmed.

The fact that telomere is smaller in CLL than in normal controls have been demonstrated previously by various authors using different methodologies^{25; 52; 53; 54; 55; 56}. This has been associated to unmutated IGHV status^{25; 52} and to worse prognosis^{55; 57}. In two different studies, Lin et al. demonstrated that reduction in telomere length is associated and precedes disease progression^{24; 53}.

In conclusion, the study of genetic abnormalities present in CLL and in MBL may collaborate to a better understanding of the pathophysiology of this leukemia. The finding that some miRNAs have abnormal expression in MBL and that this abnormality is also present in CLL suggests that these genetic abnormalities may be part of the initial events responsible for a monoclonal CD5+ B-cell proliferation. The different expression of miR-155 in MBL and CLL suggests that it may regulate pathways that have a role on the development of the disease.

The finding that telomere length in MBL is similar to CLL and shorter than normal controls suggests that it may be part of the initial events in CLL pathophysiology. This in association with the fact that clinical MBL and CLL have similar cytogenetics abnormalities and IGHV mutation status¹⁷ reinforce the hypothesis that these two entities are different stages from a same disease distinguished mainly by tumor burden.

References

- 1 Müller-Hermelink, H. K. et al. Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. In: Swerdlow, S. H.; Campo, E., *et al* (Ed.). **WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4th. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. cap. 10, p.180 - 182. (World Health Organization Classification of Tumors).
- 2 Does, G. M. et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. **Br J Haematol**, England, v. 139, n. 5, p. 809-19, 2007. ISSN 1365-2141 (Electronic)0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06856.x> >.
- 3 Marti, G. E. et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. **Br J Haematol**, v. 130, n. 3, p. 325-32, Aug 2005. ISSN 0007-1048 (Print)0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x> >.
- 4 Caligaris-Cappio, F.; Ghia, P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? **J Clin Oncol**, v. 26, n. 27, p. 4497-503, Sep 20 2008. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2007.15.4393> >.
- 5 Rawstron, A. C. et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. **Blood**, v. 100, n. 2, p. 635-9, Jul 15 2002. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 6 Rawstron, A. C. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 359, n. 6, p. 575-83, Aug 7 2008. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa075290> >.
- 7 D'Arena, G.; Musto, P. Monoclonal B-cell lymphocytosis. **Transl Med UniSa**, v. 8, p. 75-9, Jan 2014. ISSN 2239-9747 (Electronic)2239-9747 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 8 Ghia, P.; Caligaris-Cappio, F. Monoclonal B-cell lymphocytosis: right track or red herring? **Blood**, United States, v. 119, n. 19, p. 4358-62, 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-01-404681> >.
- 9 Morabito, F. et al. Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 21, p. 5890-900, Nov 1 2013. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-0622> >.
- 10 Rawstron, A. C. Monoclonal B cell lymphocytosis--what does it really mean? **Curr Hematol Malig Rep**, v. 8, n. 1, p. 52-9, Mar 2013. ISSN 1558-8211. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11899-012-0144-z> >.

-
- 11 Rawstron, A. C. et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2289-90, Oct 1 2002. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-03-0892> >.
- 12 Matos, D. M. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis in first-degree relatives of patients with sporadic (non-familial) chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 147, n. 3, p. 339-46, Nov 2009. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07861.x> >.
- 13 Goldin, L. R. et al. Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. **Br J Haematol**, England, v. 151, n. 2, p. 152-8, 2010. ISSN 1365-2141 (Electronic)0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08339.x> >.
- 14 Ghia, P. et al. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. **Blood**, United States, v. 103, n. 6, p. 2337-42, 2004. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-09-3277> >.
- 15 Shanafelt, T. D. et al. B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. **Blood**, United States, v. 113, n. 18, p. 4188-96, 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-09-176149> >.
- 16 Mulligan, C. S.; Thomas, M. E.; Mulligan, S. P. Monoclonal B-lymphocytosis: demographics, nature and subclassification in 414 community patients. **Leuk Lymphoma**, v. 52, n. 12, p. 2293-8, Dec 2011. ISSN 1029-2403 (Electronic)1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2011.598250> >.
- 17 Kern, W. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. **Br J Haematol**, v. 157, n. 1, p. 86-96, Apr 2012. ISSN 1365-2141 (Electronic)0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.09010.x> >.
- 18 Landgren, O. et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, United States, v. 360, n. 7, p. 659-67, 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0806122> >.
- 19 Chen, B. et al. Roles of microRNA on cancer cell metabolism. **J Transl Med**, v. 10, p. 228, 2012. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-10-228> >.
- 20 Alvarez-Garcia, I.; Miska, E. A. MicroRNA functions in animal development and human disease. **Development**, England, v. 132, n. 21, p. 4653-62, 2005. ISSN

- 0950-1991 (Print)0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02073> >.
- 21 Ward, B. P.; Tsongalis, G. J.; Kaur, P. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia. **Exp Mol Pathol**, v. 90, n. 2, p. 173-8, Apr 2011. ISSN 0014-4800. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.12.002> >.
 - 22 Calado, R. T.; Young, N. S. Telomere diseases. **N Engl J Med**, v. 361, n. 24, p. 2353-65, Dec 10 2009. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0903373> >.
 - 23 Verfaillie, C. M.; Pera, M. F.; Lansdorp, P. M. Stem cells: hype and reality. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 369-91, 2002. ISSN 1520-4391 (Print)1520-4383 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
 - 24 Lin, T. T. et al. Telomere dysfunction accurately predicts clinical outcome in chronic lymphocytic leukaemia, even in patients with early stage disease. **Br J Haematol**, Jul 3 2014. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13023> >.
 - 25 Damle, R. N. et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. **Blood**, United States, v. 103, n. 2, p. 375-82, 2004. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-04-1345> >.
 - 26 Gertler, R. et al. Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. **J Clin Oncol**, United States, v. 22, n. 10, p. 1807-14, 2004. ISSN 0732-183X (Print)0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2004.09.160> >.
 - 27 Ferrajoli, A. et al. Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 122, n. 11, p. 1891-9, Sep 12 2013. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-01-478222> >.
 - 28 Scatena, N. F. **Avaliação de disfunção telomérica em pacientes com carcinoma hepatocelular secundário à cirrose hepática**. 2014. 90 (Master). Genetic Department, University of Sao Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto.
 - 29 Basu, S. et al. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). **J Vis Exp**, n. 41, 2010. ISSN 1940-087x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3791/1546> >.
 - 30 Chen, C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 20, p. e179, 2005. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gni178> >.

- 31 Schmittgen, T. D. et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. **Methods**, v. 44, n. 1, p. 31-8, Jan 2008. ISSN 1046-2023 (Print)1095-9130 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.006> >.
- 32 Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. Research0034, Jun 18 2002. ISSN 1465-6906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 33 Cawthon, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 10, p. e47, May 15 2002. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 34 Fulci, V. et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4944-51, Jun 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-12-062398> >.
- 35 Marton, S. et al. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. **Leukemia**, v. 22, n. 2, p. 330-8, Feb 2008. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2405022> >.
- 36 Pallasch, C. P. et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 114, n. 15, p. 3255-64, Oct 8 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-06-229898> >.
- 37 Li, S. et al. MicroRNA Expression Profiling Identifies Activated B Cell Status in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. **PLoS One**, v. 6, n. 3, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016956> >.
- 38 Vargova, K. et al. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3816-25, Apr 7 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-05-285064> >.
- 39 Asslaber, D. et al. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 21, p. 4191-7, May 27 2010. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-07-234823> >.
- 40 Zanette, D. L. et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 11, p. 1435-40, Nov 2007. ISSN 0100-879x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

-
- 41 Dufour, A. et al. Inactivation of TP53 correlates with disease progression and low miR-34a expression in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients. **Blood**, v. 121, n. 18, p. 3650-7, May 2 2013. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-10-458695> >.
- 42 Merkel, O. et al. Interdependent regulation of p53 and miR-34a in chronic lymphocytic leukemia. **Cell Cycle**, v. 9, n. 14, p. 2764-8, Jul 15 2010. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 43 Bommer, G. T. et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. **Curr Biol**, England, v. 17, n. 15, p. 1298-307, 2007. ISSN 0960-9822 (Print)0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.068> >.
- 44 Hermeking, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 2, p. 193-9, Feb 2010. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.56> >.
- 45 Calin, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15524-9, Nov 26 2002. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.242606799> >.
- 46 Calin, G. A. et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v. 101, n. 32, p. 11755-60, 2004. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404432101> >.
- 47 Zhu, D. X. et al. Aberrant microRNA expression in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Res**, v. 35, n. 6, p. 730-4, Jun 2011. ISSN 0145-2126. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2010.11.005> >.
- 48 Sampath, D. et al. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 119, n. 5, p. 1162-72, Feb 2 2012. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-05-351510> >.
- 49 Klein, U. et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 28-40, Jan 19 2010. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.019> >.
- 50 Visone, R. et al. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 118, n. 11, p. 3072-9, Sep 15 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-01-333484> >.
- 51 Hallek, M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group

- 1996 guidelines. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5446-56, Jun 15 2008. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-093906> >.
- 52 Hoxha, M. et al. Relevance of telomere/telomerase system impairment in early stage chronic lymphocytic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 53, n. 7, p. 612-21, Jul 2014. ISSN 1045-2257. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.22171> >.
- 53 Lin, T. T. et al. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. **Blood**, v. 116, n. 11, p. 1899-907, Sep 16 2010. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-02-272104> >.
- 54 Augereau, A. et al. Telomeric damage in early stage of chronic lymphocytic leukemia correlates with shelterin dysregulation. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1316-22, Aug 4 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-07-295774> >.
- 55 Sellmann, L. et al. Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. **Int J Hematol**, v. 93, n. 1, p. 74-82, Jan 2011. ISSN 0925-5710. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-010-0750-2> >.
- 56 Rossi, D. et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, England, v. 23, n. 6, p. 1062-72, 2009. ISSN 1476-5551 (Electronic)0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.399> >.
- 57 Brugat, T. et al. Aberrant telomere structure is characteristic of resistant chronic lymphocytic leukaemia cells. **Leukemia**, England, v. 24, n. 1, p. 246-51, 2010. ISSN 1476-5551 (Electronic)0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.213> >.