Luciana Nardinelli

Avaliação da expressão de genes e miRNAs relacionados aos mecanismos de reparo ao dano do DNA em pacientes com leucemia mieloide crônica ao diagnóstico e na crise blástica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área: Distúrbios do Crescimento Celular,

Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Israel Bendit

São Paulo

2020

Aos meus pais, Roberto e Claudette, e aos meus filhos, Roberta e Enzo, pilares da minha vida.

Prof. Dr. Israel Bendit, pela orientação, confiança, liberdade em meu trabalho e pela parceria. Admiro o seu amor pela ciência.

À Roseli, pela companhia diária, apoio e amizade.

À equipe do Laboratório de Biologia Tumoral, Amanda, Antônio, Ricardo, Rodinei, Tamiris, Tatiane e Thiago, pela convivência diária e pelo apoio. Admiro cada um de vocês.

Ao Douglas Rafaelle pela ajuda na estatística.

À Dra Katia B. Barbosa Pagnano e Beatriz Felício Ribeiro da UNICAMP pelo interesse, disponibilidade e coparticipação neste trabalho.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	A LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA	2
1.2	O GENE HÍBRIDO BCR-ABL1	4
1.3	A PROTEÍNA BCR-ABL1	4
1.4	VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELA PROTEÍNA BCR-ABL1	5
1.4.1	ALTERAÇÃO DA ADESÃO AO ESTROMA MEDULAR E MATRIZ EXTRACELULAR	6
1.4.2	ATIVAÇÃO MITOGÊNICA	7
1.4.2.1	VIA JAK-STAT	7
1.4.2.2	VIA DE SINALIZAÇÃO RAS	7
1.4.3	INIBIÇÃO DA APOPTOSE	8
1.4.3.1	VIA PI3K-AKT	8
1.5	CURSO NATURAL DA LMC	9
1.6	DIAGNÓSTICO DO PACIENTE COM LMC	11
1.7	TRATAMENTO DA LMC	12
1.8	DEFINIÇÕES DA RESPOSTA MOLECULAR	14
1.9	MONITORAMENTO DO TRATAMENTO	14
1.10	INSTABILIDADE GENÔMICA NA LMC CRISE BLÁSTICA	15
1.11	MECANISMOS DE REPARO DO DANO AO DNA	17
1.12	MIRNAs	20
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivos Gerais	26
2.2	Objetivos Específicos	26

3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Aspectos Éticos da Pesquisa	28
3.2	Casuística	28
3.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE SINALIZAÇÃO DAS VIAS DE REPARO AO DANO DO DNA	
3.3.1	RT ² PROFILER PCR ARRAY	28
3.3.1.1	ELIMINAÇÃO DE DNA GENÔMICO RT ² PROFILER PCR ARRAY	29
3.3.1.2	SÍNTESE DE cDNA RT ² PROFILER PCR ARRAY	30
3.3.1.3	REAÇÃO PCR EM TEMPO REAL RT ² PROFILER PCR ARRAY	30
3.3.2	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO NA CASUÍSTICA	
	31	
3.3.2.1	SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)	31
3.3.2.2	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	31
3.3.2.3	SELEÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA.....	32
3.3.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIRNAs	33
3.3.3.1	SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR AO MIRNA	34
3.3.3.2	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL MIRNAs	35
3.3.3.3	SELEÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA.....	35
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4	RESULTADOS.....	38
4.1	RT ² PROFILER PCR ARRAY	39
4.2	RT-qPCR DOS GENES DE VIAS DE REPARO AO DANO DO DNA.....	41
4.2.1	SELEÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA.....	41
4.2.2	EXPRESSÃO DO GENE <i>GADD45G</i>	41
4.2.3	Expressão do gene <i>ATM</i>	42
4.2.4	Expressão do gene <i>TP53</i>	43
4.2.5	Expressão do gene <i>RAD9A</i>	44
4.2.6	Expressão do gene <i>ERCC1</i>	45
4.2.7	Expressão do gene <i>LIG1</i>	46

4.3	EXPRESSÃO DE MIRNAs	47
4.3.1	EXPRESSÃO MIR-17-5P	47
4.3.2	EXPRESSÃO MIR-34A	48
4.3.3	EXPRESSÃO DO MIR-150	49
4.3.4	EXPRESSÃO DO MIR-155	50
4.3.5	EXPRESSÃO DO MIR-221	51
4.3.6	EXPRESSÃO DO MIR-222	52
4.4	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE REPARO E MIRNAs	53
4.5	SOBREVIDA LIVRE DE EVENTOS	55
4.6	EXPRESSAO DOS GENES DE REPARO E A RESPOSTA MOLECULAR	57
4.7	EXPRESSAO DOS MIRNAs E A RESPOSTA MOLECULAR	57
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO	72
7	REFERÊNCIAS	74
ANEXOS		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A: cariótipo [46XY, t(9;22)(q34;q11.2)] de um paciente com LMC Ph-positiva. B: Ilustração esquemática da t(9;22). Adaptado de (Deininger & Druker, 2003).

Figura 2: Estrutura dos genes *BCR*, *ABL1* e do gene quimérico *BCR-ABL1*. Os pontos de quebra dos genes *BCR* e *ABL1* estão indicados pelas setas. Os genes quiméricos formados a partir destas fusões são o gene e13a2, e14a2. Adaptado de (Provan, Gribben, 2020).

Figura 3: Representação esquemática da proteína BCR-ABL1. Adaptado de (Peiris et al, 2019).

Figura 4: Vias de sinalização da proteína BCR-ABL1. Adaptado de (Frazer, 2007).

Figura 5: Mapa das mutações do domínio quinase identificadas em amostras clínicas de pacientes resistentes ao imatinibe. Adaptado de (Soverini, 2014).

Figura 6: A) Representa o dano ao DNA causado pela proteína BCR-ABL1; B) A proteína BCR-ABL1 inibe a apoptose permitindo que a célula sobreviva com danos; C) A proteína BCR-ABL1 interage direta ou indiretamente com proteínas de reparo levando a uma baixa eficiência. Adaptado de (Burke, 2010).

Figura 7: Vias curta e longa de reparo por excisão de base. Adaptado de (Simandi, 2017).

Figura 8: Vias de reparo de quebra de dupla fita. (A) Junção de fitas não homólogas; (B) Recombinação homóloga; (C) Anelamento de fita simples e (D) Junção alternativa. Adaptado de (Ceccaldi, 2016).

Figura 9: Biogênese do miRNA. Adaptado de (Jafri et al, 2019).

Figura 10: O papel dos miRNAs na resposta ao dano do DNA. A: Regulação direta onde quase todos os componentes primários das vias de reparo de dano ao DNA estão sujeitos à regulação de miRNAs, incluindo sensores ou mediadores, transdutores de sinais e efetores. B:

Regulação indireta onde os miRNAs regulam componentes que controlam alvos importantes como a p53. Adaptado de (Liu and Lu, 2012).

Figura 11: Foto de gel 0,8% de agarose para avaliação de integridade das amostras de RNA.

Figura 12: Gráfico de calor da expressão dos genes de sinalização de reparo do dano ao DNA gerado pela análise do ensaio RT² Profiler PCR Array. Paciente com LMC-CB vs Normal.

Figura 13: Gráfico da expressão do gene *GADD45G* dos grupos de pacientes LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico, e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 1,13, 0,97 e 0,27, respectivamente.

Figura 14: Gráfico da expressão do gene *ATM* entre os grupos de pacientes LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e grupo controle, com médias de 6,75, 9,42 e 13,78, respectivamente.

Figura 15: Gráfico da expressão do gene *TP53* entre os pacientes dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 14,5, 22,97 e 19,52, respectivamente.

Figura 16: Gráfico da expressão do gene *RAD9A* dos pacientes dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 2,21, 1,68 e 0,97, respectivamente.

Figura 17: Gráfico da expressão do gene *ERCC1* entre os grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 27,72, 18,10 e 17,97, respectivamente.

Figura 18: Gráfico da expressão do gene *LIG1* entre os grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 2,57, 2,97 e 2,52, respectivamente.

Figura 19: Gráfico da expressão do miR-17-5p dos pacientes dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,82, 1,45 e 0,34, respectivamente.

Figura 20: Gráfico da expressão do miR-34a de pacientes com LMC crise blástica (BC), LMC-FC ao diagnóstico (CF) e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,046, 0,0043 e 0,001, respectivamente.

Figura 21: Gráfico da expressão do miR-150 dos pacientes dos grupos LMC-CB, LMC ao diagnóstico e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 4,38, 1,67 e 7,63, respectivamente.

Figura 22: Gráfico da expressão do miR-155 das amostras dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,34, 0,08 e 0,10, respectivamente.

Figura 23: Gráfico da expressão do miR-221 das amostras dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,73, 1,33 e 0,45, respectivamente.

Figura 24: Gráfico da expressão do miR-222 das amostras dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com médias de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,12, 0,49 e 0,20, respectivamente.

Figura 25: Gráfico de expressão diferencial. Os pacientes são segregados de acordo com a expressão dos respectivos genes e miRNAs estudados.

Figura 26: Relação entre a expressão do gene ERCC1 e a sobrevida livre de eventos. A mediana de expressão do gene *ERCC1* foi de 9,06.

Figura 27: Relação entre a expressão do miR-155 e a sobrevida livre de eventos. A mediana de expressão do miR-155 foi 0,068.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de classificação da fase acelerada e crise blástica de acordo com a OMS. Adaptado de (SWERDLOW, CAMPO, HARRIS, JAFFE et al, 2017).

Tabela 2. Definições de resposta hematológica, citogenética e molecular. Adaptado de (BACCARANI; SAGLIO; GOLDMAN; HOCHHAUS *et al.*, 2006).

Tabela 3: Marcos do tratamento da LMC expresso em %BCR-ABL1 em Escala Internacional Adaptado de (Hochhaus (HOCHHAUS; BACCARANI; SILVER; SCHIFFER *et al.*, 2020).

Tabela 4: Ensaios utilizados para a avaliação da expressão dos genes de reparo.

Tabela 5: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na escolha do gene de referência.

Tabela 6: Sequências das sondas de hidrólise utilizadas na escolha do gene de referência.

Tabela 7: Ensaios utilizados para avaliação da expressão de miRNAs.

Tabela 8: Valor de estabilidade dos miRNAs de referência.

Tabela 9: Características demográficas, contagens hematológicas, fase da doença ao diagnóstico e tipo de transcritos.

Tabela 10: Alterações Cromossômicas Adicionais e mutações do domínio tirosina quinase do gene ABL1 encontradas nos pacientes em crise blástica.

Tabela 11: Expressão e médias geométricas dos genes de referência RPLP0 e HPRT1 dos grupos Controle e Crise blástica.

Tabela 12: *Fold change* da expressão dos genes de reparo do ensaio RT² Profiler PCR Array. Paciente com LMC-CB vs Normal.

Tabela 13: Expressão diferencial de 59 amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico de pacientes que progrediram e não progrediram.

Tabela 14: Expressão diferencial entre 8 pacientes com LMC-FC ao diagnóstico que progrediram e 17 LMC-CB.

LISTA DE ABREVIATURAS

8-oxoG	8-oxoguanina
ABL1	<i>Abelson oncogene</i>
ACAs	Alterações Cromossômicas Adicionais
AFS	Anelamento de Fita Simples
Alt-EJ	Junção Alternativa
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutada
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BAD	<i>BCL2 Associated Agonist of Cell Death</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BID	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
CCNE2	Ciclina E2
CDC25A	<i>M-phase inducer phosphatase 1</i>
CDC25C	<i>M-phase inducer phosphatase 3</i>
CDK1	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>
CDK4	<i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>
CDK6	<i>Cyclin Dependent Kinase 6</i>
CDKN1A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
C/EBPβ	<i>CCAAT enhancer-binding protein β</i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
DDIT4	<i>DNA Damage Inducible Transcript 4</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSB	<i>Double Strand Break</i>
E2F1	<i>E2F Transcription Factor 1</i>
EC	Evolução Clonal
EIF4	Fator Iniciador de Tradução E4
ERCC1	<i>Excision Repair Cross Complementing – Group1</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GAB1	<i>GRB2 Associated Binding Protein 1</i>
GADD45G	<i>Growth Arrest and DNA-damage-induced 45 gamma</i>

HIF1A	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha</i>
IRIS	<i>International Randomized Study of Interferon versus STI571</i>
ITQ	Inibidor de Tirosina Quinase
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JFNH	Junção de Fitas não Homólogas
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LMC-CB	Leucemia Mieloide Crônica Crise Blástica
LMC-FC	Leucemia Mieloide Crônica Fase Crônica
MAPK9	<i>Mitogen-activated Protein Kinase 9</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA Damage Checkpoint 1</i>
miRNA	microRNA
MLH1	<i>MutL Homolog 1</i>
MO	Medula Óssea
MSH2	<i>MutS Homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS Homolog 6</i>
ODC	<i>Ornithine decarboxylase</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	<i>fosfoinositol-3 Kinase</i>
PRA	Proteína de Replicação A
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RAD9A	<i>RAD9 checkpoint clamp component A</i>
REB	Reparo por excisão de base
REN	Reparo por excisão de nucleotídeo
RH	Recombinação Homóloga
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RMM	Resposta Molecular Maior
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAnc	RNA não codificante
RTKs	Receptores de Tirosina Quinase

RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de PCR
SFN	<i>Stratifin</i>
SHIP-1	<i>Polyphosphate 5-phosphatase 1</i>
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SP	Sangue Periférico
STATs	Proteínas Transdutoras de Sinal e Ativadoras de Transcrição
TNFSF4	<i>TNF Superfamily Member 4</i>
XIAP	Inibidor da Proteína de Apoptose Ligado ao X
YY1	Yin Yang 1

RESUMO

Nardinelli L. Avaliação da expressão de genes e miRNAs relacionados aos mecanismos de reparo ao dano do DNA em pacientes com leucemia mieloide crônica ao diagnóstico e na crise blástica [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2020.

A leucemia mieloide crônica (LMC) é caracterizada pela translocação (9;22) que dá origem ao gene quimérico *BCR-ABL*. Este gene codifica uma proteína com atividade tirosina quinase p210 constitutivamente ativa. Os três mecanismos envolvidos na patogênese da LMC são o aumento da proliferação celular, alteração da adesão celular ao estroma e matriz medular e inibição da apoptose. A introdução dos inibidores de tirosina quinase (ITQ) mudou profundamente o curso natural da LMC, reduzindo drasticamente o risco de progressão para a crise blástica, porém uma parcela dos pacientes progride mesmo com o tratamento sucessivo com diferentes drogas e o manejo desses pacientes continua sendo um grande desafio para os clínicos. Embora a proteína BCR-ABL1 seja o principal agente na patogênese da LMC, várias outras vias podem contribuir para a progressão da doença. O acúmulo de anormalidades cromossômicas e mutações é uma característica da progressão da LMC e são mais frequentes nos pacientes na crise blástica do que nos em fase crônica e podem ocorrer tanto pelo aumento da taxa de dano ao DNA como pela alteração das vias de reparo e expressão de miRNAs, levando as células a um quadro de instabilidade genética. **Objetivo:** Avaliar a expressão de genes e miRNAs relacionados com as vias de reparo do dano ao DNA em pacientes com LMC ao diagnóstico (LMC-FC ao diagnóstico), na crise blástica (LMC-CB) e em doadores saudáveis e avaliar o potencial destes como possíveis marcadores para a progressão da LMC e para a resposta ao tratamento com inibidores de tirosina quinase. **Casuística e métodos:** As expressões dos genes *GADD45G*, *ATM*, *TP53*, *RAD9A* e *LIG1* e dos miRNAs miR-17-5p, miR-34a, miR-150, miR-155, miR-221 e miR-222 foram avaliadas em 90 amostras sendo 58 de pacientes com LMC em fase crônica ao diagnóstico, 17 de pacientes como LMC em crise blástica e 15 amostras de doadores saudáveis pela técnica de RT-QPCR utilizando-se o sistema Taqman de sondas de hibridização e quantificação relativa $2^{-\Delta Ct}$. **Resultados:** Os resultados deste estudo mostraram que tanto a expressão de genes envolvidos no sistema de reparo como miRNAs estão alterados nas amostras de pacientes em crise blástica. A expressão dos genes *ATM*, *TP53* e *ERCC1* apresentam *fold change* de 1,34 ($p = 0,030$), 1,58 ($p = 0,007$) e 0,65 ($p < 0,000$), respectivamente, quando comparamos amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico e amostras de pacientes LMC-CB. A expressão dos miRNAs também apresentou alteração de expressão, especialmente do miR-17-5p, miR-34a e miR-155, com *fold change* de 1,76 ($p < 0,000$), 0,098 ($p < 0,000$) e 0,25 ($p < 0,000$) respectivamente. A expressão do gene *ERCC1* e do miR-155 apresentaram correlação com a sobrevida livre de eventos e a do gene *ATM* e miR-150 apresentaram correlação com a resposta molecular aos 6 e 12 meses de tratamento com ITQ. **Conclusões:** A expressão de diferentes genes moduladores da resposta ao dano DNA, como *ATM* e *TP53* estão alteradas nos pacientes com LMC-CB, prejudicando a cascata de sinalização dependente desses genes. A maior expressão do gene *ERCC1* contribui para o surgimento de alterações cromossômicas adicionais através do mecanismo de anelamento de fita simples podendo aumentar a ocorrência de alterações cromossômicas adicionais. Já a maior expressão do miR-155 contribui para a redução do mecanismo de pareamento incompatível, reduzindo a expressão dos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* podendo ocasionar aumento do número de mutações como por exemplo, as mutações do domínio tirosina quinase. Além disso, a maior expressão do

gene *ERCCI* e do miR-155 podem ser utilizados como marcadores preditivos de surgimento de eventos e a maior expressão do gene *ATM* e miR-150, como marcadores da resposta molecular ao tratamento com ITQ aos 6 e 12 meses.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Crônica, Crise Blástica, Progressão da Doença, Dano ao DNA, Reparo ao DNA, Expressão Gênica, MicroRNA, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

ABSTRACT

Nardinelli L. Evaluation of the expression of genes and miRNAs related to DNA damage repair in patients with chronic myeloid leukemia at diagnosis and blast crisis [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2020.

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by translocation (9; 22) that gives rise to the chimeric BCR-ABL gene. This gene encodes a p210 protein with constitutively active tyrosine kinase activity. The three mechanisms involved in CML pathogenesis are the increase in cell proliferation, alteration of cell adhesion to the stroma and bone marrow matrix, and apoptosis inhibition. The introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKI) has profoundly changed CML's natural course, drastically reducing blast crisis progression. However, a portion of patients progresses even with successive treatment with different drugs, and the management of these patients remains a significant challenge for clinicians. Although the BCR-ABL1 protein is the principal-agent in CML's pathogenesis, several other pathways can contribute to its progression. The accumulation of chromosomal abnormalities and mutations is a characteristic of the progression of CML and is more frequent in patients in blast crisis than in those in chronic phase and can occur both by increasing the rate of DNA damage and by altering the repair and expression pathways of miRNAs, leading the cells to a picture of genetic instability. Objective: To evaluate the expression of genes and miRNAs related to DNA damage repair pathways in patients with CML at diagnosis (CML-CP at diagnosis), blast crisis (CML-BC), and in healthy donors and assess their potential as possible markers for CML progression and response to treatment with tyrosine kinase inhibitors. Casuistry and methods: The expressions of the GADD45G, ATM, TP53, RAD9A, and LIG1 genes and miRNAs miR-17-5p, miR-34a, miR-150, miR-155, miR-221, and miR-222 were evaluated in 90 samples 58 from patients in CML-CP at diagnosis, 17 from patients with CML-BC, and 15 samples from healthy donors using the RT-qPCR technique using the Taqman probes and relative quantification $2^{-\Delta C_t}$. Results: This study showed that both, the expression of genes involved in the repair system and miRNAs, are altered in samples from patients in blast crisis. The expression of the ATM, TP53, and ERCC1 genes has a fold change of 1.34 ($p = 0.030$), 1.58 ($p = 0.007$), and 0.65 ($p < 0.001$), respectively, when comparing samples from patients with CML- CP at diagnosis and samples from LMC-BC. The expression of miRNAs also showed changes in expression, especially of miR-17-5p, miR-34a, and miR-155, with a fold change of 1.76 ($p < 0.001$), 0.098 ($p < 0.001$) and 0.25 ($p < 0.001$), respectively. The expression of the ERCC1 gene and miR-155 correlated with event-free survival and that of the ATM and miR-150 gene correlated with the molecular response at 6 and 12 months of treatment with ITQ. Conclusions: Different genes modulating the response to DNA damage, such as ATM and TP53, are altered in patients with CML-BC, impairing the signaling cascade dependent on these genes. The greater expression of the ERCC1 gene contributes to the appearance of additional chromosomal changes through a single-strand annealing mechanism. The higher expression of miR-155 contributes to the reduction of the incompatible pairing mechanism, reducing the expression of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes thus contributing to BCR-ABL1 kinase domain mutations. Furthermore, the greater expression of the ERCC1 gene and miR-155 can be used as predictive markers of the free event survival and the greater expression of the ATM gene and miR-150, as markers of the molecular response to treatment with ITQ at 6 and 12 months.

Key words: Leukemia, Myelogenous, Chronic, Blast Crisis, Disease Progression, DNA Damage, DNA Repair, Gene Expression, MicroRNAs, Real-time Polymerase Chain Reaction.

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias sólidas ou hematológicas exibem uma heterogeneidade significativa em termos de morfologia, marcadores celulares de superfície, lesões genéticas, cinética de proliferação celular e resposta ao tratamento. Todas essas características também podem ser vistas nos tumores clonais, ou seja, que têm início a partir de uma única célula (DICK, 2008).

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença clonal caracterizada pela presença da t(9;22) que codifica uma proteína tirosina quinase ativa constitutivamente e responsável pelo início e manutenção da doença. Apesar da eficiência das drogas inibidoras de tirosina quinase, alguns pacientes podem não responder ao tratamento ou recair após resposta inicial. Em alguns casos, o desenvolvimento da resistência pode ser acompanhado ou seguido pela progressão da Fase Crônica (FC) para a Crise Blástica (CB), esta última caracterizada por um pior prognóstico. A evolução da FC para a CB é um processo multifatorial, e no qual podemos observar o surgimento de anormalidades citogenéticas secundárias, a interrupção do processo de diferenciação celular, alterar o processo de transcrição, edição e tradução do RNA que em conjunto com alterações epigenéticas e metabólicas podem levar à expansão do número de células malignas (BAVARO; MARTELLI; CAVO; SOVERINI, 2019).

1.1 A LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal caracterizada pela hiperplasia de células mieloides e por achados típicos no hemograma, como a leucocitose, desvio à esquerda, basofilia e plaquetose, sendo responsável por 15 a 20% dos novos casos de leucemias em adultos (SAWYERS, 1999) e com uma incidência de 1,6 por 100.000 adultos com ligeira predominância do sexo masculino, 1,4:1, representando aproximadamente 15% de todas as leucemias.

As estatísticas mostram que nos EUA, em 2020, serão diagnosticados 8.450 novos casos de LMC, sendo 4.970 homens e 3.480 mulheres, com 1.130 óbitos e desde a introdução do tratamento com inibidores de tirosina quinase, a mortalidade anual reduziu de 10%-20% para 1%-2% e consequentemente a prevalência da doença aumentou de 30.000 casos no ano 2.000 para 150-180.000 em 2020 (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020). A LMC tem A idade média dos pacientes com LMC varia entre 60 e 65 e a incidência aumenta com a idade. A

causa etiológica é desconhecida, entretanto a radiação ionizante é leucemogênica e alguns indivíduos expostos à explosão da bomba atômica no Japão, em 1945, desenvolveram LMC (PROVAN, GRIBBEN, 2020).

Cerca de 50% dos pacientes com LMC são assintomáticos e o diagnóstico ocorre durante exame físico ou hemograma de rotina. Os sinais e sintomas mais comuns, quando presentes, são decorrentes da anemia e da esplenomegalia e inclui fadiga, perda de peso, cansaço, saciedade precoce e dor no hipocôndrio esquerdo. Raras manifestações incluem sangramento associado à baixa contagem ou disfunção plaquetária e trombose (associada à trombocitose ou leucocitose exacerbada). A esplenomegalia é um achado comum no exame físico, presente em cerca de 20 a 40% dos casos (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020).

Entre todos os tipos de doenças hematológicas a LMC foi a primeira a ser associada a uma anormalidade genética específica, conhecida como cromossomo Filadélfia (Ph) (Figura 1) que é resultado da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11.2)$ (ROWLEY, 1973).

Como resultado da $t(9;22)$ ocorre a justaposição dos genes *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) e *ABL1* (*Abelson oncogene*) no cromossomo 22 e esse gene quimérico *BCR-ABL1* codifica uma proteína que possui um domínio tirosina quinase ativo responsável pela transformação maligna na LMC (SCORE; CALASANZ; OTTMAN; PANE *et al.*, 2010).

Figura 1: A: cariótipo [46XY, $t(9;22)(q34;q11.2)$] de um paciente com LMC Ph-positiva. B: Ilustração esquemática da $t(9;22)$. Adaptado de (DEININGER; DRUKER, 2003).

1.2 O GENE HÍBRIDO BCR-ABL1

O gene de fusão *BCR-ABL1* consiste da extremidade 5' do gene *BCR* e da 3' do gene *ABL1*. A localização dos pontos de quebra genômica dos genes *BCR* e *ABL1* são muito variáveis, mas geralmente a recombinação envolve a fusão dos introns 13 e 14 do *BCR* com uma região de 140 kb do *ABL1* entre os exons 1b e 1a. Independentemente do ponto de quebra no gene *ABL1*, o *splicing* alternativo dá origem principalmente aos transcritos com junções e13a2 e e14a2 (Figura 2). Esses transcritos foram denominados anteriormente como b2a2 e b3a2, respectivamente. Ambos os transcritos resultam na expressão de uma proteína BCR-ABL1 de 210-kDa (SCORE; CALASANZ; OTTMAN; PANE *et al.*, 2010).

Figura 2: Estrutura dos genes *BCR*, *ABL1* e do gene quimérico *BCR-ABL1*. Os pontos de quebra dos genes *BCR* e *ABL1* estão indicados pelas setas. Os genes quiméricos formados a partir destas fusões são o gene e13a2, e14a2. Adaptado de (Provan, Gribben, 2020).

1.3 A PROTEÍNA BCR-ABL1

É importante lembrar que os genes *BCR* e *ABL1*, são expressos normalmente nas células e possuem funções específicas. O gene *BCR* é expresso constitutivamente nas células hematopoiéticas, principalmente nos estágios mais precoces da diferenciação mieloide e

parece regular negativamente a proliferação celular e a transformação oncogênica através da formação de um complexo trimérico com as proteínas AF-6 (Ras Association Family 6) e RAS, inibindo a sinalização deste último (PEIRIS; LI; DONOGHUE, 2019). Já a proteína ABL1 tem seu papel influenciado pela localização subcelular e modificações pós-translacionais. No citoplasma está relacionada ao aumento da proliferação celular mas em resposta ao estresse genotóxico, ABL1 é translocada para o núcleo e/ou mitocôndria e sua atividade contribui na modulação do reparo ao DNA, indução à apoptose e inibição do crescimento celular (DASGUPTA; KOPTYRA; HOSER; KANTEKURE *et al.*, 2016).

A proteína BCR-ABL1 p210 possui os domínios Ser/Thr quinase, Rho/GEF e de dimerização do BCR que está ligado aos domínios SH, rico em Prolina e de ligação ao DNA e à actina do ABL1. A região SH1 tirosina quinase é a mais estudada do domínio BCR-ABL1 devido ao seu papel na patogênese da LMC. Embora a fusão BCR-ABL1 contenha a maior parte do gene ABL1, o sítio N-terminal é perdido e acredita-se que por isso a ativação da proteína BCR-ABL1 seja constitutiva. Na proteína ABL1 normal a porção N-terminal é responsável pela auto inibição do domínio SH1 (ZHANG; ADRIÁN; JAHNKE; COWAN-JACOB *et al.*, 2010).

Figura 3: Representação esquemática da proteína BCR-ABL1. Adaptado de (PEIRIS; LI; DONOGHUE, 2019).

A proteína de 210kDa exerce papel fundamental no processo leucemogênico, estimulando vias de sinalização que contribuem com a transformação maligna.

1.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELA PROTEÍNA BCR-ABL1

Três principais mecanismos estão relacionados com a transformação maligna mediada pela proteína BCR-ABL1: (1) adesão alterada ao estroma da medula e matriz extracelular; (2) sinalização mitogênica ativa constitutivamente e (3) inibição da apoptose.

1.4.1 ALTERAÇÃO DA ADESÃO AO ESTROMA MEDULAR E MATRIZ EXTRACELULAR

A diferenciação do compartimento hematopoiético a partir da célula tronco hematopoiética é um processo altamente regulado que depende de interações específicas entre o estroma medular e as células hematopoiéticas para que a proliferação, diferenciação e maturação ocorram de forma adequada.

A LMC é caracterizada pela liberação precoce e circulação de progenitores hematopoiéticos sendo que estes apresentam alteração da capacidade de interagir com as células endoteliais dos sinusóides da medula para deixarem o microambiente da medula. Assim, o fenótipo maligno dos progenitores hematopoiéticos na LMC parece ser acompanhado de mecanismos de adesão modificados e por alterações na função ou expressão de receptores de adesão na superfície da célula (VERFAILLIE, McCARTH, McGLAVE, 1992).

Estudos demonstram que a alteração no mecanismo de adesão ocorre por duas vias, sendo uma independente de tirosina quinase e outra dependente de tirosina quinase (WERTHEIM; FORSYTHE; DRUKER; HAMMER *et al.*, 2002).

Enquanto progenitores normais aderem ao estroma via receptores $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ integrinas, uma parte dos progenitores leucêmicos expressa receptores para $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ integrina conhecidos por interagir com laminina e colágeno IV presentes na membrana basal. Estas observações indicam que a liberação precoce de progenitores leucêmicos na circulação pode ser causada pela perda das interações adesivas com o estroma e/ou fibronectina e a aquisição de interações adesivas com componentes da membrana basal dos sinusóides da medula (SALESSE; VERFAILLIE, 2002).

A proteína CRKL, um dos principais substratos da $p210^{BCR-ABL}$, pode estar envolvida em vários processos de sinalização, inclusive na regulação da adesão ((UEMURA; GRIFFIN, 1999). A CRKL serve como adaptador para que a $p210^{BCR-ABL}$ se ligue à paxilina e vinculina, duas proteínas características de adesões focais (SALGIA; UEMURA; OKUDA; LI *et al.*, 1995). Este complexo constitutivo mediado pela $p210^{BCR-ABL}$ com proteínas envolvidas na sinalização da integrina pode também transduzir, constitutivamente, sinais que são regulados normalmente pela integrina ou ativar receptores de fatores de crescimento e ser responsável pela alteração da adesão e mobilidade das células leucêmicas. Além disso, a ativação e

fosforilação constitutiva de várias proteínas de adesão focal podem mantê-las indisponíveis para a sinalização mediada por integrina, levando a uma diminuição da adesão dos progenitores leucêmicos (SALESSE; VERFAILLIE, 2002).

1.4.2 ATIVAÇÃO MITOGÊNICA

1.4.2.1 VIA JAK-STAT

As proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STATs) são ativadas por muitas citocinas com ação sobre células hematopoiéticas e fatores de crescimento. Elas regulam ciclo celular, apoptose e proliferação de diferentes células através da influência na transcrição de genes (BOWMAN; GARCIA; TURKSON; JOVE, 2000). Devido às STATs serem ativadas constitutivamente em certas doenças oncohematológicas, elas parecem desempenhar função importante na leucemogênese (BAŚKIEWICZ-MASIUK; MACHALIŃSKI, 2004). As STATs são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes que são fosforilados após ligação de citocinas ou fatores de crescimento com seu respectivo receptor na superfície da célula. Após esta ligação, as subunidades do receptor formam dímeros e levam à justaposição das proteínas Jaks. Isto resulta na transfosforilação e ativação da sua atividade quinase e a fosforilação das STATs que, então, formam dímeros e migram para o núcleo onde desencadeiam mudanças na expressão gênica ativando-a (RAVANDI; TALPAZ; ESTROV, 2003). As principais STATs envolvidas na LMC são a STAT3 e STAT5 sendo que a ativação constitutiva da primeira inibe a diferenciação celular (COPPO; FLAMANT; DE MAS; JARRIER *et al.*, 2006), já a STAT5 parece ter uma função mais importante na proliferação celular, porém também está envolvida na apoptose de células blásticas (BAŚKIEWICZ-MASIUK; MACHALIŃSKI, 2004).

1.4.2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO RAS

A via de sinalização RAS é absolutamente necessária para a transformação mediada pela proteína BCR-ABL1. A expressão constitutiva de BCR-ABL1 resulta em um acúmulo da forma ativa, RAS-GTP (CORTEZ; KADLEC; PENDERGAST, 1995). A família das proteínas RAS pertence à superfamília das GTPases que estão localizadas na superfície interna da membrana plasmática e possuem função importante em várias vias de sinalização

mediadas por receptores de tirosina quinase (RTKs) e outros receptores. Uma vez induzida, RAS ativa Raf serina/treonina quinase que então fosforila MAPK quinases (também denominadas MEKs). Estas por sua vez ativam MAPKs (ou ERKs), que migram para o núcleo onde fosforilam e ativam fatores de transcrição nuclear. Esta cascata modula proliferação celular regulando a atividade de várias proteínas reguladoras de ciclo celular e fatores de transcrição (RAVANDI; TALPAZ; ESTROV, 2003).

1.4.3 INIBIÇÃO DA APOPTOSE

1.4.3.1 VIA PI3K-AKT

A proteína BCR-ABL1 ativa a fosfoinositol-3 quinase (PI3K), uma quinase de lipídeos que fosforila fosfoinositóis na posição D-3' do anel inositol. A PI3K é um heterodímero formado por uma subunidade regulatória de 85 kDa (p85) e uma subunidade catalítica de 110 kDa (p110) (SKORSKI; KANAKARAJ; NIEBOROWSKA-SKORSKA; RATAJCZAK *et al.*, 1995).

A via PI3K-AKT tem função importante no mecanismo anti-apoptótico e leucemogênico mediado pela proteína BCR-ABL1.

Os fosfolipídios gerados da ação da PI3K agem sobre a AKT que é translocada do citoplasma para a parte interna da membrana plasmática e ativada após fosforilação. A AKT regula os mecanismos anti-apoptóticos fosforilando diretamente componentes do aparato de morte celular como a proteína BAD e caspase 9 (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999).

A família das proteínas BCL2 é subdividida em membros pro- e anti-apoptóticos. Os membros pro-apoptóticos incluem BAD, BAX e BID, enquanto os anti-apoptóticos incluem BCL-2 e BCL-XL (KEESHAN; COTTER; MCKENNA, 2002).

Quando BAD encontra-se fosforilada não consegue se ligar e inibir BCL-2 e BCL-XL, que estão localizadas na membrana mitocondrial, e assim não ocorre a liberação do citocromo C. Portanto, a ativação constitutiva de BAD anula sua habilidade de induzir morte celular.

Além do mecanismo mediado por BAD, AKT também fosforila caspase 9 que tem como função iniciar a cascata das caspases. A fosforilação da caspase 9 impede a liberação do citocromo C e portanto, a apoptose (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999).

Figura 4: Vias de sinalização da proteína BCR-ABL1. Adaptado de (FRAZER; IRVINE; MCMULLIN, 2007).

1.5 CURSO NATURAL DA LMC

A LMC segue um curso bi ou trifásico que se inicia na fase crônica e progride para a fase acelerada e depois para a fase terminal denominada de crise blástica (RANDOLPH, 2005).

Geralmente a doença é diagnosticada na fase crônica em mais de 80% dos pacientes (CORTES, 2004) e, sem tratamento efetivo, a sobrevida média é de 3 a 5 anos. Durante esta fase da doença ocorre uma grande expansão do compartimento de células granulocíticas, mas as células ainda retêm a capacidade de diferenciação e as funções também se encontram normais. Em quase 50% dos pacientes a LMC fase crônica é diagnosticada por exames de rotina, sendo que o esfregaço de sangue periférico é caracterizado pelo desvio à esquerda, ou seja, há um aumento das células mais imaturas circulantes, embora os blastos representem apenas 5% da contagem de leucócitos totais. Já o aspirado ou biópsia de medula óssea apresenta-se hiper celular e demonstra hiperplasia da série granulocítica e megacariocítica, basofilia e cerca de 5% de blastos ou menos (Provan, Gribben, 2020). Os sintomas na fase crônica geralmente são moderados e muitos pacientes são assintomáticos. Entre os pacientes sintomáticos, fadiga, perda de peso, esplenomegalia, sangramento e sudorese são comuns. Após uma média de 4 a 5 anos, a doença progride para a fase acelerada, caracterizada pelo aumento de células mais imaturas no sangue periférico, sintomas constitucionais e uma resposta menos favorável à terapias com ITQ (DEININGER; DRUKER, 2003).

Cerca de 15% dos pacientes apresentam na fase acelerada. Os critérios para definição da fase acelerada não são universais e de acordo com o critério utilizado parte dos pacientes diagnosticados como fase crônica pode ser reclassificada como fase acelerada. A evolução clonal (EC) é um critério comum para fase acelerada entre as classificações existentes e pode ocorrer entre 20% e 40% dos pacientes. As anormalidades cromossômicas mais comuns associadas à EC são a trissomia do cromossomo 8, duplicação do cromossomo Ph, o isocromossomo 17, trissomia do 19, perda do cromossomo Y, trissomia do 21 e monossomia do 7 (JOHANSSON; FIORETOS; MITELMAN, 2002). Nesta fase, o hemograma demonstra aumento do número de mieloblastos (10% - 20% no sangue periférico ou medula óssea), basófilos (20% no sangue periférico) e eosinófilos, assim como o aparecimento ou agravamento da anemia e plaquetopenia. A sobrevida dos pacientes na fase acelerada é de 1 a 2 anos (CORTES, 2004). O reconhecimento da progressão da doença é importante tanto para o tratamento como para o prognóstico e quando a progressão é classificada apenas considerando-se os critérios clínicos e morfológicos, os pacientes na fase acelerada da LMC formam um grupo bastante heterogêneo, porém a importância desses critérios aumenta quando avaliados em conjunto com parâmetros moleculares, como resposta a terapia com inibidor de tirosina quinase e presença de mutações do domínio quinase, que passaram a fazer parte dos critérios provisionais para a caracterização da fase acelerada. De acordo com os parâmetros provisionais, um paciente em fase crônica pode ser considerado funcionalmente como fase acelerada se houver (1) se houver resistência hematológica ao primeiro inibidor de tirosina quinase, (2) qualquer grau de resistência ao tratamento sequencial com inibidor de tirosina quinase e (3) ocorrência de 2 ou mais mutações do domínio quinase do gene *BCR-ABL1* durante a vigência do tratamento com inibidores de tirosina quinase (SWERDLOW, CAMPO, HARRIS, JAFFE et al, 2017).

A terceira fase é denominada de crise blástica e é caracterizada pela presença de mais de 20% de blastos no sangue periférico ou medula óssea ou ainda, pela presença da doença blástica extramedular. As áreas mais comuns para a manifestação da fase blástica extramedular são os linfonodos, pele, ossos e sistema nervoso central. A fase blástica é caracterizada pela instabilidade genética levando ao acúmulo de anormalidades genéticas/citogenéticas adicionais ao cromossomo Ph e geralmente é refratária ao tratamento (SHAH, 2008; SHAH; NICOLL; NAGAR; GORRE *et al.*, 2002) independentemente do tipo de diferenciação celular, podendo, ocasionalmente, ter duas ou mais linhagens afetadas sendo que 50% dos casos são de origem mieloide, 25% linfóide e 15% indiferenciada. A fase

blástica é geralmente fatal, com uma sobrevida inferior a um ano (CALABRETTA; PERROTTI, 2004).

Tabela 1. Critérios de classificação da fase acelerada e crise blástica de acordo com a OMS. Adaptado de (SWERDLOW, CAMPO, HARRIS, JAFFE et al, 2017).

Fase	Critérios
Acelerada	<ul style="list-style-type: none"> • Blastos (SP ou MO) 10-19% • Basófilos (SP) $\geq 20\%$ • Plaquetas $< 100 \times 10^9/L$ não relacionado à terapia; ou $> 100 \times 10^9/L$ não responsiva à terapia • Anormalidades cromossômicas clonais adicionais nas células Ph positivas ao diagnóstico, que incluem um segundo cromossomo Ph, trissomia do 8, isocromossomo 17, trissomia do 19, cariótipos complexos ou anormalidades do 3q26.2 • Qualquer nova anormalidade clonal nas células Ph positivas que ocorra durante a terapia • Aumento do tamanho do baço e aumento da contagem de leucócitos ($> 10 \times 10^9/L$) não responsivos à terapia.
Acelerada - provisórios	<ul style="list-style-type: none"> • Resistência hematológica ao primeiro ITQ (ou falha em obter RHC ao primeiro ITQ) • Qualquer indicação de resistência hematológica, citogenética ou molecular a dois inibidores (sequencial) <p>Ou</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ocorrência de duas ou mais mutações no domínio quinase BCR-ABL durante a terapia com ITQ
Crise Blástica	<ul style="list-style-type: none"> • $\geq 20\%$ de blastos (SP ou MO) • Grandes focos ou aglomerados de blastos na biópsia de medula óssea ou extra medulares.

1.6 DIAGNÓSTICO DO PACIENTE COM LMC

De acordo com o European Leukemia Net 2020 para o diagnóstico da LMC é importante realizar o aspirado medular para a análise morfológica já que a proporção de células blásticas e basófilos é importante para distinguir a fase da doença e, além disso, para realizar a citogenética. É mandatório realizar a RT-PCR convencional para caracterização do tipo de transcrito, já que cerca de 2-4% dos pacientes apresentam transcritos atípicos como e13a3, e14a3, e19a2, entre outros. O PCR quantitativo não é mandatório ao diagnóstico e caso o ensaio molecular seja positivo para BCR-ABL1, mas o cromossomo Ph não foi visualizado pela citogenética convencional, é recomendado realizar o FISH. Compõem também estas

recomendações, o exame físico, principalmente para avaliação do tamanho do baço e do fígado, o perfil bioquímico e sorológico, principalmente para hepatite B, e eletrocardiograma. Outros testes e procedimentos podem ser realizados dependendo das características individuais do paciente, história médica e comorbidades (HOCHHAUS; BACCARANI; SILVER; SCHIFFER *et al.*, 2020).

1.7 TRATAMENTO DA LMC

Atualmente os pacientes com LMC são tratados com inibidores de tirosina quinase tais como mesilato de imatinibe, dasatinibe, nilotinibe, bosutinibe e ponatinibe e a resposta do paciente frente ao tratamento é avaliada sob três aspectos: 1) resposta hematológica, definida como a completa normalização hematimétrica no sangue periférico e ausência de esplenomegalia; 2) resposta citogenética, definida pela proporção de metáfases Ph-positivas, 3) resposta molecular, definida através da quantificação do transcrito *BCR-ABL1* por RT-qPCR (HOCHHAUS; BACCARANI; SILVER; SCHIFFER *et al.*, 2020). As definições de resposta hematológica, citogenética e molecular utilizadas no tratamento da LMC com ITQs estão descritas na **Tabela 2**.

O estudo IRIS (International Randomized Study of Interferon versus STI571), estudo randomizado que comparou a eficácia do tratamento com mesilato de imatinibe (400 mg) frente ao tratamento padrão com interferon alfa e baixa dose de citarabina, mostrou que, após 10 anos de acompanhamento, 93,1% dos pacientes atingiram Resposta Molecular Maior (RMM) e 63,2% RMM 4,5. Entre os pacientes que tiveram avaliação molecular aos 12 meses de tratamento, a taxa de sobrevida global foi de 91,1% entre os que atingiram RMM e 85,3% para os que não atingiram ($p=0,15$). Em uma análise envolvendo apenas óbitos por LMC a taxa de sobrevida foi de 97,8% para pacientes que atingiram RMM e de 89,4% para os que não atingiram ($p = 0,07$). Taxas similares foram observadas aos 18 meses de tratamento, ou seja a taxa de sobrevida global foi de 93% para pacientes que atingiram RMM e de 85,6% para os que não atingiram RMM ($p = 0,04$). A taxa de sobrevida livre de doença foi de 100% para os pacientes que atingiram RMM e de 90,5% para os que não atingiram ($p<0,001$) (HOCHHAUS; LARSON; GUILHOT; RADICH *et al.*, 2017).

Tabela 2. Definições de resposta hematológica, citogenética e molecular. Adaptado de (BACCARANI; SAGLIO; GOLDMAN; HOCHHAUS *et al.*, 2006).

Resposta	Definições
Hematológica	
Completa	<ul style="list-style-type: none"> • Contagem de leucócitos $< 10 \times 10^9/L$ • Plaquetas $< 450 \times 10^9/L$ • Basófilos $< 5\%$ • Ausência de células imaturas • Ausência de esplenomegalia
Parcial	<ul style="list-style-type: none"> • Persistência de células imaturas • Plaquetas abaixo de 50% dos níveis do pré-tratamento, mas acima de $450 \times 10^9/L$
Citogenética	
Completa	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência completa de células Ph+
Parcial	<ul style="list-style-type: none"> • 1% a 35% de células Ph+
Menor	<ul style="list-style-type: none"> • 36% a 65% de células Ph+
Mínima	<ul style="list-style-type: none"> • 66% a 95% de células Ph+
Molecular	
Completa	<ul style="list-style-type: none"> • Transcritos BCR-ABL indetectáveis pelo PCR em tempo real quantitativo e/ou Nested em duas amostras de consecutivas
Maior (RM ^{3,0})	<ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL $\leq 0,1\%$ (IS)
RM ^{4,0}	<ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL $\leq 0,01\%$ (IS)
RM ^{4,5}	<ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL $\leq 0,0032\%$ (IS)

A introdução de ITQs mudou o curso natural da LMC, reduzindo a frequência de progressão para a crise blástica, porém apesar dos índices alcançados com o tratamento com mesilato de imatinibe, cerca de 20% dos pacientes com LMC apresentam resistência, sendo que o principal mecanismo envolvido são as mutações pontuais do domínio quinase da proteína BCR-ABL1 que estão presentes em cerca de 25-30% dos pacientes em fase crônica e 70-80% dos em crise blástica (DRUKER; GUILHOT; O'BRIEN; GATHMANN *et al.*, 2006).

Além das mutações do domínio quinase, as células leucêmicas acumulam anormalidades genéticas ao longo do curso da doença. As anormalidade associadas com a progressão da fase crônica para a crise blástica incluem cromossomos adicionais (+Ph, +8, +19); isocromossomo 17q (associado com a perda de *TP53*), outras translocações recíprocas (3;21) e (7;11), outras translocações e inversões associadas a leucemia mieloide aguda e mielodisplasia, incluindo inv(3) e t(15;17) e mutações no *TP53* e RAS (BACCARANI; SAGLIO; GOLDMAN; HOCHHAUS *et al.*, 2006).

Figura 5: Mapa das mutações do domínio quinase identificadas em amostras clínicas de pacientes resistentes ao imatinibe. Adaptado de (SOVERINI; BRANFORD; NICOLINI; TALPAZ *et al.*, 2014).

1.8 DEFINIÇÕES DA RESPOSTA MOLECULAR

A resposta ao tratamento da LMC deve ser monitorada através da quantificação do transcrito *BCR-ABL1* através técnica de qRT-PCR e esta deve ser expressa de acordo com a Escala Internacional estabelecida no Estudo IRIS e reportada como %BCR-ABL1, em escala logarítmica onde 1%; 0,1%; 0,01%; 0,0032% e 0,001% correspondem a redução de 2; 3; 4; 4,5 e 5 logs, respectivamente (Cross, 2012). A redução do número de transcritos *BCR-ABL1* para 0,1%, definida como Resposta Molecular Maior (RMM), é considerada o marco mais importante no tratamento da LMC já que prediz uma sobrevida próxima de 100% pois a progressão raramente ocorre nesse nível de (HUGHES; BRANFORD, 2006).

1.9 MONITORAMENTO DO TRATAMENTO

O monitoramento da resposta ao tratamento deve ser realizado através da contagem absoluta e diferencial das células sanguíneas a cada 2 semanas até a resposta hematológica completa ou normalização dos índices hematimétricos. O RT-qPCR, expresso em %*BCR-ABL1* na Escala Internacional, deve ser realizado a cada 3 meses mesmo após atingir a RMM. A realização da citogenética pode auxiliar, mas sozinha não é o suficiente para monitorar a resposta ao tratamento devido a sua sensibilidade, porém esta técnica se faz importante para os pacientes com translocações atípicas que não podem ser monitorados pelo qPCR e também

em pacientes que apresentam falha ao tratamento para excluir possíveis anormalidades cromossômicas adicionais (ACAs).

Os marcos mais importantes para a monitoração do tratamento da LMC com ITQs são os níveis de *BCR-ABL1* aos 3, 6 e 12 meses que vão determinar se o tratamento deve continuar (resposta ótima) ou se deve ser trocado (falha ou resistência) ou se deve ser cuidadosamente considerado para continuação ou troca (atenção), dependendo das características do paciente, comorbidades ou tolerância, como mostra a **Tabela 3**.

Exames adicionais de RT-qPCR podem ser solicitados caso a cinética da resposta não seja conclusiva ou se toxicidade ou intolerância causar interrupções ou reduções na dose do medicamento (HOCHHAUS; BACCARANI; SILVER; SCHIFFER *et al.*, 2020).

Tabela 3: Marcos do tratamento da LMC expresso em %BCR-ABL1 em Escala Internacional Adaptado de (Hochhaus (HOCHHAUS; BACCARANI; SILVER; SCHIFFER *et al.*, 2020).

	RESPOSTA ÓTIMA	ATENÇÃO	FALHA
AO DIAGNÓSTICO	N/A	Alto risco ACA	N/A
3 MESES	$\leq 10\%$	$>10\%$	$>10\%$ se confirmado em 1 a 3 meses
6 MESES	$\leq 1\%$	$>1-10\%$	$>10\%$
12 MESES	$\leq 0,1\%$	$>0,1-1\%$	$>1\%$
A QUALQUER MOMENTO	$\leq 0,1\%$	$>0,1-1\%$ ou perda da MMR	$>1\%$, mutações do domínio quinase ou ACAs de alto risco

1.10 INSTABILIDADE GENÔMICA NA LMC CRISE BLÁSTICA

Estudo realizado por Jain et cols (2017) em pacientes com LMC em crise blástica mostrou que, nesse grupo de pacientes, a incidência de evolução clonal é mais frequente que as mutações pontuais do domínio quinase do gene *ABL1*, sugerindo, assim, que a

transformação da LMC é resultado de um complexo processo molecular, mais do que simplesmente o desenvolvimento de resistência ao inibidor de tirosina quinase. (JAIN, 2017)

Outros estudos mostram que a instabilidade genética nas células progenitoras leucêmicas pode ser responsável pelo acúmulo das mutações pontuais do domínio quinase da proteína BCR-ABL1 (Figura 4) e que estas podem resultar tanto do aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) quanto pela perda de mecanismos de reparo ao DNA (GIRERD; TOSCA; HERAULT; VIGNON *et al.*, 2018) (SKORSKI, 2007).

Muito do dano ao DNA endógeno tem origem na ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íon hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), gerados como subprodutos de reações redox do metabolismo normal, principalmente durante a respiração celular e replicação do DNA (ZHOU; SHAO; SPITZ, 2014). Linhagens celulares *BCR-ABL1* transformadas e células leucêmicas produzem cerca de 2 a 6x vezes mais EROs que suas similares normais, o que pode, consequentemente, levar a um aumento de bases oxidadas, como a 8-oxoG, e a um aumento da taxa de quebra de dupla fita de DNA (JACKSON; LOEB, 2001). Esse aumento de EROs se deve a dispersão de elétrons da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria devido a fosforilação de STAT3 pela proteína BCR-ABL1 (ZOUÉIN; DUHÉ; ARANY; SHIREY *et al.*, 2014).

O reparo ineficiente das bases oxidadas e quebras de dupla fita de DNA podem levar a uma variedade de mutações pontuais e alterações cromossômicas. Células CD34+ leucêmicas apresentam a via de reparo de trocas de bases ineficiente, o que facilita o acúmulo de mutações pontuais (NOWICKI; FALINSKI; KOPTYRA; SLUPIANEK *et al.*, 2004).

Os sistemas de reparo agem removendo os danos ao DNA e assim preservam a integridade da informação genômica. Se muito dano é causado, as vias de apoptose são ativadas para eliminar as células com lesões potencialmente mutagênicas e irreparáveis (STOKLOSA; POPLAWSKI; KOPTYRA; NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 2008). Geralmente, as células leucêmicas são tolerantes aos danos principalmente por apresentarem uma proteção contra a apoptose mediada pela proteína BCR-ABL1 (SKORSKI, 2002a).

Alguns estudos têm demonstrado que, além do estresse proliferativo, existe uma relação entre a expressão de BCR-ABL1 e o nível de atividade de proteínas envolvidas no reparo ao dano ao DNA, principalmente aquelas envolvidas na quebra da dupla fita de DNA (DSB) (SKORSKI, 2002b); (SLUPIANEK; FALINSKI; ZNOJEK; STOKLOSA *et al.*, 2013).

Figura 6: A) Representa o dano ao DNA causado pela proteína BCR-ABL1; B) A proteína BCR-ABL1 inibe a apoptose permitindo que a célula sobreviva com danos; C) A proteína BCR-ABL1 interage direta ou indiretamente com proteínas de reparo levando a uma baixa eficiência. Adaptado de (BURKE; CARROLL, 2010).

1.11 MECANISMOS DE REPARO DO DANO AO DNA

Após o DNA ser danificado, tem início o processo de reparo que ocorre através de um conjunto de mecanismos que percebem o dano, sinaliza sua presença e promovem o reparo, com o envolvimento de moléculas de sinalização, transdução de sinal e efetoras, respectivamente. O recrutamento dos fatores responsáveis pelo reparo é um processo regulado espaço temporalmente no qual os fatores são acomodados no local onde ocorreu o dano de uma maneira sequencial e coordenada (CHATTERJEE; WALKER, 2017).

Os principais mecanismos de reparo ao dano do DNA em células de mamíferos são:

- Reparo por excisão de base (REB): repara principalmente danos causados por oxidação e alquilação.
- Reparo por excisão de nucleotídeo (REN): remove lesões causadas por distorções da dupla hélice de DNA.
- Reparo de quebra de dupla fita: pode ser subdividido em junção de fitas não homólogas (JFNH), recombinação homóloga (RH), anelamento de fita simples (AFS) e junção alternativa (Alt-EJ) (MAYNARD; FANG; SCHEIBYE-KNUDSEN; CROTEAU *et al.*, 2015).

Entretanto, alguns tipos de danos são substratos para vias de tolerância ao dano do DNA. Em eucariotos superiores, por exemplo, um grupo muito bem orquestrado de polimerases que desviam do dano para que a replicação continue, porém com a possibilidade da introdução de uma base incorreta que pode se tornar uma mutação no próximo ciclo de replicação. Sob essas condições, quando o dano ao DNA persiste, a morte celular programada ou apoptose deve ser ativada (CHATTERJEE; WALKER, 2017).

Na maioria dos casos, os danos gerados por EROs são reparados pela via longa do mecanismo de excisão de base (REB), porém se a célula for incapaz de reparar as lesões antes da forquilha de replicação, a tolerância a essas alterações pode ocorrer. Além disso, EROs também podem induzir a quebra de dupla fita (Friedberg, Waker, Suede, Wood et al, 2006)

O passo inicial da via longa do reparo por excisão de base é a mobilização de enzimas DNA glicosilases que, no caso de lesões oxidativas, são bifuncionais e não apenas clivam a base danificada, mas também clivam uma sequência de DNA, de 2 a 10 nucleotídeos, deixando tanto um α,β aldeído insaturado ou um fosfato ligado na porção 3' da incisão. O açúcar é, então, removido pela atividade da endonuclease apurínica APE1 e o grupo fosfato, pela polinucleotídeo quinase (PNK). Os nucleotídeos corretos são inseridos na sequência pelas polimerases δ ou ϵ , sendo a fita danificada deslocada e removida por FEN-1 (Flap endonuclease 1) e, por último, a incisão é selada pela Ligase 1 (WALLACE, 2014).

Figura 7: Vias curta e longa de reparo por excisão de base. Adaptado de (SIMANDI, 2017).

A quebra de fita dupla de DNA representa a lesão mais citotóxica e pode ocorrer durante o metabolismo normal das células e replicação do DNA, bem como por exposição à radiação ionizante ou a agentes químicos mutagênicos. Caso não seja reparada apropriadamente, essa lesão pode levar a uma série de mutações que, se os mecanismos de checagem de ciclo celular estiverem intactos, podem levar a célula a apoptose ou se não, induzirem a transformação da célula pela ativação de oncogenes ou pela perda de função de genes supressores de tumor (BERNSTEIN; BERNSTEIN; PAYNE; GAREWAL, 2002).

O reparo à quebra de dupla de fita de DNA ocorre através de uma cascata de sinalização mediada pela proteína ataxia-telangiectasia mutada (ATM), uma proteína serina/treonina quinase que age como molécula transdutora de sinal ao dano ao DNA. Em resposta a quebra de dupla de fita de DNA, a proteína quinase torna-se um monômero ativo num processo envolvendo autofosforilação na Ser1981. A ATM na sua forma ativa hiperfosforila e ativa CHK2 que por sua vez fosforila substratos chaves como CDC25A e CDC25C o que leva a parada do ciclo celular na fase S ou G2/M respectivamente (PINDER; ATTWOOD; DELLAIRE, 2013).

A partir daí o reparo de quebra de dupla fita pode ocorrer por quatro vias diferentes. A primeira via pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, sendo a quebra das fitas com corte cego e pela junção de fitas não homólogas. Nesta via o reparo ocorre independentemente da sequência de DNA que é incorporada e requer fatores como o Ku70/80, DNA PKCs e a Ligase IV. Apesar da mutagenicidade do mecanismo de junção de fitas não homólogas, este é rápido e visa preservar a integridade do genoma, prevenindo as possíveis translocações (DIFILIPPANTONIO; ZHU; CHEN; MEFFRE *et al.*, 2000)

Alternativamente, a quebra de dupla fita pode deixar a extremidade 3' saliente e quando isso acontece o reparo pode acontecer por recombinação homóloga (RH), anelamento de fita simples (AFS) e junção alternativa (Alt-EJ).

A RH é um processo livre de erros e ocorre preferencialmente na fase S e G2 do ciclo celular onde a taxa de replicação do DNA é maior (KARANAM; KAFRI; LOEWER; LAHAV, 2012).

Como esta via utiliza uma cromátide irmã ou homóloga para realizar o reparo, este processo necessita da ação de recombinase RAD51.

Já na via AFS ocorre a junção entre o ponto de quebra e repetição de nucleotídeos intercalados no genoma e envolve a Proteína de Replicação A (PRA) e a proteína RAD52. Nesta via ocorre perda de informação genética (HEYER; EHMSSEN; LIU, 2010).

O mecanismo da via Alt-EJ ainda não é totalmente esclarecido, mas sabe-se que é altamente prejudicial para a integridade genômica, podendo gerar translocações cromossômicas e rearranjos mutagênicos (SIMSEK; JASIN, 2010).

Atualmente, a expressão anormal de microRNAs (miRNAs) também tem sido relacionada com o desenvolvimento de neoplasias malignas e alguns destes reconhecidos como marcadores da doença e também com alvos terapêuticos (SONG; LIN; WU; GONG *et al.*, 2011).

Figura 8: Vias de reparo de quebra de dupla fita. (A) Junção de fitas não homólogas; (B) Recombinação homóloga; (C) Anelamento de fita simples e (D) Junção alternativa. Adaptado de (CECCALDI; RONDINELLI; D'ANDREA, 2016).

1.12 MIRNAS

Os miRNAs foram descritos pela primeira vez em 1993 quando dois estudos independentes demonstraram que a natureza do gene heterocrônico *lin-4* da *C. elegans* era um pequeno RNA não codificante (RNAnc) (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Mais tarde, Reinhart e cols também descreveu que outro gene heterocrônico, *let-7* também era um RNAnc e que os dois RNAnc eram capazes de, através de uma interação RNA-RNA com a região 3'UTR de genes alvos, iniciar uma cascata temporal de genes heterocrônicos (REINHART; SLACK; BASSON; PASQUINELLI *et al.*, 2000). Em 2001 Lee e Ambros observaram que

ao longo do desenvolvimento larval da *C. elegans* pelo menos 10 a 15 miRNAs são expressos e que suas funções são estágio específicas (LEE; AMBROS, 2001).

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes de 20-24 nucleotídeos que são gerados a partir de transcritos endógenos em forma de grampios e regulam negativamente a expressão gênica. Esse mecanismo ocorre por pareamento parcial a sítios complementares de RNA mensageiros (RNAm) alvos, geralmente na porção 3'UTR, levando a uma repressão translacional e/ou degradação do mRNA (Figura 5). Trabalhos experimentais e *in silico* indicam que um miRNA pode silenciar uma média de 100 RNAm e que cerca de 60% dos genes codificantes humanos parecem conter sítios de ligação a miRNAs (LEE; AMBROS, 2001).

Assim, os miRNAs exercem importante função em vários processos biológicos e sua desregulação pode afetar processos fundamentais, tais como proliferação, controle do ciclo celular, apoptose, diferenciação e metabolismo celular levando a célula a uma transformação (DI LEVA; GAROFALO; CROCE, 2014).

O tema mais frequente nos estudos que relacionam miRNAs e câncer é a alteração significativa da expressão dos miRNAs nas células tumorais quando comparadas às suas equivalentes normais. Os tumores de forma geral apresentam uma expressão característica de miRNAs denominada miRNoma e que define seu estado maligno e seu quadro clínico-patológico (JANSSON; LUND, 2012).

Nos últimos anos existe um esforço por parte de vários pesquisadores para se caracterizar um perfil de expressão de miRNAs da LMC, bem como aquele que poderia determinar a sua evolução para as fases mais avançadas da doença (CALIN; CROCE, 2006); (AGIRRE; JIMÉNEZ-VELASCO; SAN JOSÉ-ENÉRIZ; GARATE *et al.*, 2008); (FLAMANT; RITCHIE; GUILHOT; HOLST *et al.*, 2010).

Estudos *in silico* demonstraram que genes alvos de determinados miRNAs podem estar associados com a patogênese da LMC, tais como miR-150, miR-19a, miR-19b, miR-17, miR-20, miR-221, miR-222, let7c, miR-155, entre outros e que os alvos destes são principalmente as vias da MAPkinase e PI3K, vias responsáveis principalmente pelo aumento da proliferação característica da LMC e podem levar a resistência a tratamentos (MACHOVÁ POLÁKOVÁ; LOPOTOVÁ; KLAMOVIČ; BURDA *et al.*, 2011).

Figura 9: Biogênese do miRNA. Adaptado de (JAFRI et al, 2019)

Embora não haja uma superposição completa dos resultados desses estudos, a redução da expressão do miR-150 é um achado consistente e está inversamente relacionado com a expressão de MYB, um ativador de transcrição (BURCHERT; WANG; CAI; VON BUBNOFF *et al.*, 2005). Estudos mostram que a expressão de MYB está relacionada com a de BCR-ABL1 e este dado é consistente com um modelo de crise blástica murino no qual MYB é necessário para a leucemogênese dependente de BCR-ABL1 (GORDON, WONG, RASKO, 2013).

Bueno e cols (2008) demonstraram que o miR-203 age como supressor de tumor, pois pode estar silenciado por perda monoalélica e hipermetilação do alelo remanescente. O miR-203 regula tanto ABL1 como BCR-ABL1 e seu silenciamento está associado com o aumento da expressão destes genes. Este efeito pode ser revertido experimentalmente pela restauração do miR-203 seja por transfecção como pelo uso de agentes hipometilantes (BUENO; PÉREZ DE CASTRO; GÓMEZ DE CEDRÓN; SANTOS *et al.*, 2008).

Em outro estudo, Li e cols demonstraram que o miR-9 estava pouco expresso em células K562 resistentes ao mesilato de imatinibe quando comparadas a células sensíveis. Os autores mostraram ainda que o gene *ATP Binding Cassette B1* (ABCB1), também conhecido como *Multidrug Resistance Gene* (MDR1) é alvo direto do miR-9 na LMC, podendo modular a resposta ao tratamento (LI; ZHAO; LI; MIAO *et al.*, 2017).

Os mecanismos de reparo aos danos do DNA requerem a ação de um grande número de vias cuidadosamente reguladas. Embora essas vias sejam em grande parte reguladas transcricionalmente, ficou claro que as proteínas envolvidas nessa resposta também podem sofrer regulação pós - transcricional. Assim, os miRNAs têm demonstrado importante função tanto como efetores dos mecanismos de reparo ao DNA, bem como reguladores da sua evolução (SAN JOSÉ-ENÉRIZ; ROMÁN-GÓMEZ; JIMÉNEZ-VELASCO; GARATE *et al.*, 2009).

Um dos sinais iniciais de dano ao DNA é a fosforilação da H2AX que é uma variante da família de proteínas H2A que por sua vez são componentes do octâmero de histona nos nucleossomos. A fosforilação de H2AX dependente de ATM/ATR causa o acúmulo de MDC1 (Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1), que é um regulador importante do microambiente na vizinhança do DNA danificado. Um estudo em células hematopoiéticas totalmente diferenciadas demonstrou que o miR-24 afeta o reparo ao DNA reduzindo a expressão de H2AX, assim células que possuem o aumento da expressão de miR-24 apresentam 2 vezes mais quebras cromossômicas e fragmentos (LANDAU; SLACK, 2011). Além disso, em alguns casos de leucemia linfocítica crônica de mau prognóstico ficou demonstrado que o miR24 estava deletado (LAL; PAN; NAVARRO; DYKXHOORN *et al.*, 2009).

Outra via de reparo regulada por miRNA é a via do ATM. O miR-421 parece suprimir ATM, resultando no aumento da sensibilidade a radiação ionizante. A expressão de miR-421 é induzida pelo fator de transcrição NMYC, um oncogene frequentemente amplificado em neoblastoma, estabelecendo uma sinalização no qual NMYC suprime o reparo ao dano do DNA (Hu et al, 2010). Outro estudo em pacientes e portadores do gene ATM demonstrou que o miR-125b também é um importante alvo de ATM, suprimindo TNFSF4 (TNF Superfamily Member 4) causando um rompimento nessa regulação explicaria o risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama apresentado tanto por pacientes como por portadores de ATM (SMIRNOV; CHEUNG, 2008).

O reparo ao dano ao DNA também pode ocorrer pela via da *TP53*, um gene supressor de tumor que possui como alvo o miR-34a que, por sua vez, age sobre a *CCNE2*, *CDK4* e *BCL-2*. Outros miRNAs alvo do *TP53* são miR-192, miR-194 e miR-215 que podem por sua vez aumentar a expressão de p53 e p21, induzindo a parada do ciclo celular (PICHIORRI; SUH; ROCCI; DE LUCA *et al.*, 2016).

Figura 10: O papel dos miRNAs na resposta ao dano do DNA. A: Regulação direta onde quase todos os componentes primários das vias de reparo de dano ao DNA estão sujeitos à regulação de miRNAs, incluindo sensores ou mediadores, transdutores de sinais e efetores. B: Regulação indireta onde os miRNAs regulam componentes que controlam alvos importantes como a p53. Adaptado de (LIU; LU, 2012).

É fato que o uso de inibidores de tirosina quinase no tratamento de pacientes com LMC mudou o curso da doença para a maioria dos pacientes, porém uma parcela destes, mesmo com o uso sucessivo das diferentes drogas disponíveis, evolui para a crise blástica, fase esta, de difícil manejo e que muitas vezes é fatal. Desta forma é necessário aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na evolução da LMC e estabelecer marcadores que possam identificar aqueles pacientes que apresentam maior probabilidade de evoluir para a crise blástica e desta forma, intervir para evitar esse quadro. Além disso, os dados da literatura são escassos e muitas vezes conflitantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a expressão de genes relacionados com as vias de reparo ao dano do DNA em pacientes com LMC ao diagnóstico e na crise blástica.

- Avaliar a expressão de miRNAs em pacientes com LMC ao diagnóstico e na crise blástica que possam estar envolvidos na regulação pós-transcricional de genes envolvidos no reparo ao dano do DNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os genes estudados como potenciais marcadores de progressão da LMC.

- Avaliar os genes estudados como potenciais marcadores de resposta ao tratamento com ITQ.

- Avaliar os miRNAs estudados como potenciais marcadores de progressão da LMC.

- Avaliar os miRNAs estudados como potenciais marcadores de resposta ao tratamento com ITQ.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o registro N° 16220 em 09/02/2017, segundo as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96 e 251/97) e contou com a coparticipação da Universidade Estadual de Campinas.

3.2 CASUÍSTICA

Foram avaliadas 90 amostras de RNA, obtidas por Trizol™ (Invitrogen, USA) de acordo com o protocolo do fabricante, sendo 58 de pacientes com LMC em fase crônica, 17 em crise blástica e 15 doadores normais. O diagnóstico dos pacientes foi confirmado pela presença do cromossomo Ph através de análise citogenética e amplificação do transcrito *BCR-ABL1* pela técnica RT-PCR para caracterização do tipo de transcrito.

O monitoramento dos pacientes foi realizado no Laboratório de Biologia Tumoral do HCFMUSP, de acordo com protocolo descrito por Nardinelli, 2008, ao diagnóstico e aos 3, 6, 12 e 18 meses e, de acordo com o European Leukemia Net 2013, realizou-se a pesquisa de mutações do domínio quinase do gene *ABL1* nos pacientes que apresentaram falha ao tratamento. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Biologia Tumoral do HCFMUSP pela técnica de sequenciamento direto, com protocolo descrito por Nardinelli, 2008.

3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE SINALIZAÇÃO DAS VIAS DE REPARO AO DANO DO DNA

3.3.1 RT2 PROFILER PCR ARRAY

Nesta primeira etapa avaliamos o perfil de expressão de genes envolvidos nos mecanismos de reparo entre um paciente em crise blástica com mutações do domínio tirosina quinase do gene *ABL1* e um pool de doadores normais para fazermos uma triagem dos genes envolvidos na sinalização das vias de reparo ao dano do DNA a serem estudados na nossa

casuística. Para tanto, utilizamos placas RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Alemanha) PAHS-029ZA que é uma ferramenta confiável para avaliar a expressão de um painel de genes relevantes para uma via ou doença através da técnica de PCR em tempo real e permite, através de reagentes otimizados, amplificar os transcritos de interesse simultaneamente sob condições de ciclagem uniformes. Neste ensaio, foram avaliadas as expressões de 84 genes envolvidos na sinalização de dano ao DNA das seguintes vias: ATM/ATR (ATM, ATR, ATRIP, BARD1, BRCA1, CDC25A, CHEK1, CHEK2, CSNK2A2, FANCD2, H2AFX, HUS1, MDC1, PARP1, RAD1, RAD17, RAD50, RAD9A, RBBP8, RNF168, SMC1A, TOPBP1, TP53); reparo por excisão de nucleotídeo (CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, LIG1, NTHC1, OGG1, PCNA, PNKP, RPA1, SIRT1, TP53, XPA, XPC); reparo por excisão de base (APEX1, FEN1, LIG1, MBD4, NTHL1, OGG1, PARP1, PCNA, TP53, UNG, XRCC1); reparo de *mismatch* (ABL1, EXO1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, PCNA, PMS1, PMS2, TP53); reparo de quebra de dupla fita (ATM, BLM, BRCA1, CHEK1, H2AFX, HUS1, LIG1, MDC1, MLH1, MRE11A, NBN, PRKDC, RAD50, RAD51, RPA1, TP53BP1, XRCC2, XRCC6); apoptose (ABL1, ATM, BARD1, BAD, BBC3, BRCA1, CDKN1A, CHEK2, C1B1, CSNK2A2, PPP1R15A, PRKDC, RAD21, RAD9A, SIT1, TP53, TP73) e ciclo celular (ATM, ATR, ATRIP, CDC25A, CDK7, CDKN1A, CHEK1, CHEK2, DDIT3, MAPK12, MCPH1, MDC1, PPP1R15A, TP53, TP73). Além dos genes citados foram avaliados 5 genes de referência, beta-actina, beta-2-microglobulina, GAPDH, HPRT1 e RPLPO, além de um controle de contaminação com DNA genômico, 3 controles da reação de transcrição reversa e 3 controles da PCR. Neste ensaio foram utilizadas 2 placas, sendo uma para uma amostra de paciente em crise blástica que apresentava as mutações F317L e F359V do domínio tirosina quinase do *ABL1* e a outra para um *pool* de amostras de controles normais, a fim de termos uma visão geral das possíveis alterações na expressão dos genes de reparo da paciente em crise blástica.

O protocolo utilizado foi o preconizado pelo fabricante e na primeira etapa, realizamos a eliminação do DNA genômico que poderia estar presente nas amostras.

3.3.1.1 ELIMINAÇÃO DE DNA GENÔMICO RT2 PROFILER PCR ARRAY

Após descongelamento dos reagentes, realizamos a etapa de eliminação de DNA genômico. Para esta etapa utilizamos 1µg de RNA, 2µL de tampão GE e água livre de RNase qsp 10µL. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 42°C e, posteriormente, colocados

rapidamente no gelo por pelo menos 1 minuto. Em relação ao *pool* de doadores normais, este foi constituído de 1µg de RNA de uma das amostras.

Em seguida realizamos a síntese do DNA complementar das amostras do paciente em crise blástica e do *pool* de doadores, de acordo com o protocolo do fabricante.

3.3.1.2 SÍNTESE DE cDNA RT² PROFILER PCR ARRAY

A síntese do DNA complementar foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando-se 4 µL do tampão BC3 5x, 1µL do Controle P3, 2µL do *mix* RE3 e 3 µL de água livre de RNase. Esse mix foi, então, adicionado ao tubo com a amostra preparada no item 3.3.1.1. A reação foi incubada a 42°C por exatamente 15 minutos e depois a 95°C por 5 minutos. Ao final desse processo, foram adicionados 91µL de água com homogeneização e o produto foi armazenado no gelo. Em seguida, foi realizada a reação de PCR em tempo real.

3.3.1.3 REAÇÃO PCR EM TEMPO REAL RT2 PROFILER PCR ARRAY

A reação de PCR em tempo real foi preparada de acordo com o protocolo preconizado pelo fabricante, utilizando-se 1.350µL de RT² SYBR Green ROX™ qPCR Mastermix, 102µL do cDNA sintetizado no item 3.6.1.4 e 1.248µL de água livre de RNase, totalizando um volume final de 2.700µL.

Foram dispensados 25µL do mix da PCR em tempo real em cada cavidade da placa e a amplificação foi realizada em termociclador em tempo real StepOnePlus (AppliedBiosystems, USA) com o seguinte protocolo: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados da corrida foram analisados em plataforma do próprio fabricante: <https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>, com *threshold* de 0,1.

A partir dos resultados obtidos neste ensaio foram escolhidos os genes de reparo que apresentaram maior redução de expressão na amostra do paciente em crise blástica e, então estes foram avaliados nas 90 amostras de RNA da nossa casuística e para esta etapa foi necessário realizar a síntese do DNA complementar das amostras.

3.3.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO NA CASUÍSTICA

3.3.2.1 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se o kit GoScript™ Reverse Transcriptase 160U/μL (Promega, USA).

Em um microtubo estéril e livre de nucleases, adicionamos água livre de RNase em volume proporcional ao volume de RNA necessário para que obtivéssemos 1μg de RNA.. Então, foram adicionados 2μL de uma solução 0,3μg/μL de oligonucleotídeos randômicos (Invitrogen, USA). A solução foi incubada a 70°C por 5 minutos e logo após, colocada no gelo. Posteriormente, foram adicionados 8,4μL do mix composto por 4μL do tampão 5x que acompanha a enzima e 1μL de dNTP 10mM, 2,4μL de MgCl₂ 25mM e 1μL da enzima. Foi realizada uma nova incubação a 25°C por 5 minutos, seguida de 42°C por 60 minutos. Após a síntese, o cDNA foi armazenado em freezer a -20°C. Após a síntese de cDNA, realizamos a reação de PCR quantitativo em tempo real.

3.3.2.2 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

As expressões dos genes de reparo foram avaliadas por qRT-PCR, utilizando-se ensaios Taqman™ inventariados (*Applied Biosystems*, USA). Os ensaios utilizados estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4: Ensaios utilizados para a avaliação da expressão dos genes de reparo.

GENE	ENSAIO
<i>ATM</i>	Hs01112355_g1
<i>TP53</i>	Hs00153340_m1
<i>GADD45G</i>	Hs02566147_s1
<i>RAD9A</i>	Hs00270240_m1
<i>ERCC1</i>	Hs01012158_m1
<i>LIG1</i>	Hs01553527_m1

As reações foram realizadas no equipamento Rotor-Gene Q 5Plex (Qiagen, Alemanha) e as amostras foram testadas em duplicatas, tanto para o gene alvo como para o gene de

referência e para monitorarmos possíveis contaminações, incluímos um controle de reagentes sem amostra de cDNA.

O protocolo utilizado teve 15µL de volume final, sendo 7,5µL de Taqman™ Universal Master Mix 2x (Applied Biosystems™, USA), 0,75µL do respectivo ensaio 20x, 1,5µL da amostra de cDNA e água grau biologia molecular qsp 15µL.

A ciclagem utilizada para a amplificação foi: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C 15 segundos e 60°C por 1 minuto e o *threshold* utilizado foi de 0,04.

Para a quantificação da expressão foi utilizado o método $2^{-\Delta Ct}$, onde Ct (threshold cycle) indica o ciclo no qual podemos observar amplificação acima do limiar determinado (*threshold*). Desta forma temos que ΔCt é a diferença entre o valor de Ct do gene alvo e do gene de referência de uma amostra (PFAFFL, 2001).

A seleção de um gene de referência apropriado é essencial para a validação da normalização de dados obtidos por RT-qPCR e desta forma ter uma correta quantificação da expressão gênica (PFAFFL; TICHOPAD; PRGOMET; NEUVIANS, 2004), assim realizamos a escolha do melhor gene de referência entre *ABL*, *BCR* e *GUSβ*.

3.3.2.3 SELEÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA

Para normalizar os resultados de expressão dos genes avaliados neste estudo, realizamos uma seleção do melhor gene de referência, ou seja, o que apresentava menor variação de expressão entre amostras de pacientes dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e grupo Controle. Para isso, utilizamos 10 amostras de cada grupo e avaliamos a expressão dos genes *ABLI*, *BCR* e *GUSβ*. O cDNA utilizado nesta etapa foi sintetizado como no item 3.6.1.6.2 e as amostras foram testadas em duplicatas, utilizando-se o equipamento Rotor-Gene 5Plex (Qiagen, Alemanha).

O protocolo de reação utilizado para cada replicata foi: 7,5µL de Universal Taqman Master Mix (Applied Biosystems, USA) 2x, sonda Taqman a uma concentração final de 0,1µM, primer senso e antiseno a uma concentração final de 0,2µM, 1,5µL de cDNA e água grau biologia molecular q.s.p. para um volume final de 15µL. As sequências dos *primers* e sondas estão descritos na **Tabela 5 e 6**.

Tabela 5: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na escolha do gene de referência.

GENE	SEQUÊNCIA
ABL senso	5' TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT 3'
ABL antisenso	5' GATGTAGTTGCTTGGGACCCA 3'
BCR senso	5' CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT 3'
BCR antisenso	5' CTGCGATGGCGTTCAC 3'
GUS β senso	5' GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT 3'
GUS β antisenso	5' CCGAGTGAAGATCCCCCTTTTA 3'

Tabela 6: Sequências das sondas de hidrólise utilizadas na escolha do gene de referência.

GENE	SEQUÊNCIA
ABL	FAM-TCCATCTCGCTCATCATCACCGACA-QSY
BCR	FAM- CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-QSY
GUS β	FAM-CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA-QSY

Para analisarmos os dados e determinar o gene de referência mais adequado para o nosso estudo utilizamos o algoritmo “NormFinder” que utiliza um modelo matemático de expressão gênica com base estatística sólida para estimar não apenas a variação global dos genes de referência candidatos, mas também a variação entre subgrupos de uma mesma amostragem (ANDERSEN, 2004).

3.3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIRNAS

Foram avaliadas as expressões dos miRNAs miR-17-5p, miR-34a, miR-150, miR-155, miR-221 e miR-222 nas 90 amostras de RNA da nossa casuística. A escolha dos miRNAs a serem avaliados foi baseada em estudo de Machová e cols (2011) que utilizou a técnica de microarray para avaliar a expressão destes em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença.

A primeira etapa a ser realizada para avaliarmos a expressão dos miRNAs foi a síntese de cDNA para os ensaios. Como as amostras utilizadas neste estudo já se encontravam

extraídas pelo Trizol™ (Invitrogen, USA), optamos por realizar a transcrição reversa “primer”- específica.

3.3.3.1 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR AO MIRNA

Para a transcrição reversa dos miRNAs utilizamos o kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA) e 5 ng de RNA total.

Figura 11: Foto de gel 0,8% de agarose para avaliação de integridade das amostras de RNA.

O mix da reação de transcrição reversa foi realizado utilizando-se 1,5 µL do tampão 10x, 0,15µL da solução de dNTPs 100mM, 0,19µL do inibidor de RNase (20U/µL), 1,0µL de MultiScribe RT, 3,0µL do respectivo Primer RT e água livre de RNase qsp 15µL.

A reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador convencional Veriti™ (Applied Biosystems, USA) com o seguinte protocolo: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. Finalizada a reação de transcrição reversa, realizamos a PCR em tempo real para estudo da expressão dos miRNAs escolhidos.

3.3.3.2 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL miRNAs

A expressão dos miRNAs foi avaliada utilizando-se ensaios TaqMan™ MicroRNA Assays (Thermo Fisher, USA), descritos na **Tabela 7**, utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. O mix de reação foi realizado utilizando-se 10µL de Taqman™ Universal Mastermix II 2x, no UNG, 1µL do respectivo TaqMan™ MicroRNA Assays 20x, 1,5µL do respectivo cDNA e 7,5µL de água grau biologia molecular. As amostras foram testadas em duplicatas, tanto para o miRNA alvo como o de referência.

Tabela 7: Ensaios utilizados para avaliação da expressão de miRNAs.

MiRNA	ENSAIO
miR-17-5p	000393
miR-34a	000426
miR-150	000473
miR-155	000479
miR-221	000524
miR-222	002276
U6snRNA	001973
RNU44	001094
miR-203	000507

A reação de RT-qPCR foi realizada em termociclador Rotor Gene Q 5PLEX (Qiagen, Alemanha) seguindo o protocolo de amplificação de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Terminada a etapa de amplificação as reações foram analisadas com threshold de 0,04 e a expressão dos miRNAs foi calculada utilizando-se o método de $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.3.3.3 SELEÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA

O miRNA de referência utilizado para normalizar a expressão dos miRNAs estudados foi o RNU44, após avaliação no algoritmo NormFinder. Todos os genes de referência avaliados apresentaram valor de estabilidade menores que 0,15, como preconiza o algoritmo e

os genes de referência comparados foram U6 snRNA, RNU44 e miR-203. O valor de estabilidade de cada um deles está descrito na **Tabela 8**.

Tabela 8: Valor de estabilidade dos miRNAs de referência.

miRNA	Valor de estabilidade
RNU44	0,006
U6snRNA	0,012
miR-203	0,011

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizarmos a comparação entre os grupos avaliados foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados foram analisados calculando-se o Log *fold change*, sendo que consideramos *fold change* como a razão entre $2^{-\Delta Ct}$ LMC fase crônica ao diagnóstico e $2^{-\Delta Ct}$ Controle ou LMC crise blástica. Além disso, gráficos Box Plot foram utilizados para visualização de tendências.

Para o gráfico de expressão diferencial (*heatmap*) foi utilizada uma matriz de expressão normalizada para uma distribuição Z. Já para a modelagem de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier, considerando-se como evento: I) se o paciente não atingiu a RMM aos 12 meses; II) se houve troca de medicamento por não atingir RMM aos 12 meses; III) se houve progressão para fase acelerada ou crise blástica e IV) se houve óbito.

Por último foi utilizada uma regressão logística para correlacionar a expressão de cada gene e miRNA avaliado com a resposta molecular aos 3, 6 e 12 meses. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

4 RESULTADOS

Foram avaliadas 90 amostras de RNA, sendo 58 em fase crônica ao diagnóstico, 17 com LMC em crise blástica e 15 doadores normais. As características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC estão descritas na **Tabela 9** e as alterações cromossômicas adicionais e mutações do domínio tirosina quinase do gene *ABL1* encontradas nos pacientes em crise blástica, encontram-se na **Tabela 10**.

Tabela 9: Características demográficas, contagens hematológicas, fase da doença ao diagnóstico e tipo de transcritos.

Variáveis	Mediana	%
Características demográficas		
Idade ao diagnóstico	46 (16-75) anos	
Gênero M/F	41/34	55/45
Tempo de acompanhamento (anos)	13(1 – 15)	---
Contagens Hematológicas ao Diagnóstico		
Hemoglobina (g/Dl)	11,2 (4,53-16,2)	---
Leucócitos (mil/mm ³)	113,65 (11,2-499,3)	---
Plaquetas (mil/mm ³)	334 (90-1.500)	---
Basófilos (mil/mm ³)	2,85 (0-30,9)	---
Fase da doença ao Diagnóstico		
	N	
Fase Crônica	69	92
Fase Acelerada	4	5
Crise Blástica	2	3
Tipo de transcrito		
	N	
e13a2	26	35
e14a2	44	59
e13a2/e14a2	5	6

Tabela 10: Alterações Cromossômicas Adicionais e mutações do domínio tirosina quinase do gene ABL1 encontradas nos pacientes em crise blástica.

ACAs	Mutações
Cromossomo Ph, trissomia do cromossomo 10 e t(15;21)	F317L
Translocação complexa t(9;10;11;22)(q34;q25;q22;q110)	T315I e F317L
Duplo Ph e 21q+ e del(22)(q11)	F317L/F359V
Cromossomo Ph e t(3;21)	F359V
Duplo Ph, del 3(p13p23) e trissomia cromossomo 8	F330L
Cromossomo Ph e trissomia do cromossomo 5; 6, 8 e 21	T315I

4.1 RT² PROFILER PCR ARRAY

Para a análise dos dados obtidos pelo RT² Profiler PCR Array foi realizado o envio dos dados brutos da corrida de qRT-PCR para a plataforma do fabricante e o ensaio pode ser validado pois todas as amostras atingiram os critérios de qualidade como de reprodutibilidade, controle de transcrição reversa e ausência de contaminação por DNA genômico.

Para a escolha do gene de referência para normalização dos dados foi escolhida a opção “seleção automática do painel de genes de referência”, desta forma foi identificado o conjunto de genes de referência através da média geométrica que diferiu o mínimo possível entre as amostras. Os resultados encontram-se na **Tabela 11**.

Tabela 11: Expressão e médias geométricas dos genes de referência RPLP0 e HPRT1 dos grupos Controle e Crise blástica.

GENE	CONTROLE	PACIENTE CB
RPLP0	19,33	19,11
HPRT1	26,38	26,84
MÉDIA GEOMÉTRICA	22,58	22,65

Como podemos observar na **Figura 12** e na **Tabela 12**, a amostra do paciente com LMC - CB apresentou alteração da expressão de vários genes que regulam diferentes vias de reparo de dano ao DNA em relação ao doador normal.

Foram escolhidos, nesta etapa, os genes que apresentaram maior redução da expressão como o *GADD45G* (*fold change* -62,50), *ERCC1* (*fold change* -27,15), *RAD9A* (*fold change* -

16,16) e *LIG1* (fold change -27,05). Os genes *ATM* (fold change -3,34) e *TP53* (fold change -8,00), que também apresentaram redução de expressão, foram escolhidos por apresentarem função crucial na sinalização do dano ao DNA.

Figura 12: Gráfico de calor da expressão dos genes de sinalização de reparo do dano ao DNA gerado pela análise do ensaio RT² Profiler PCR Array. Paciente com LMC-CB vs Normal.

Tabela 12: Fold change da expressão dos genes de reparo do ensaio RT² Profiler PCR Array. Paciente com LMC-CB vs Normal.

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1 -2,36	APEX1 - 4,75	ATM - 3,34	ATR - 1,34	ATRIP -15,95	ATRX - 1,36	BARD 1 1,49	BAX -2,78	BBC3 - 3,56	BLM 1,32	BRCA 1 -1,98	BRIP1 2,01
B	CDC25A 4,72	CDC25 C 1,40	CDK7 1,05	CDKN1 A -4,07	CHEK1 4,95	CHEK2 -1,44	CIB1 -7,36	CRY1 -3,17	CSNK2A2 -4,58	DDB1 - 5,48	DDB2 - 2,21	DDIT3 -2,62
C	ERCC1 -27,15	ERCC2 -5,20	EXO1 9,82	FANCA -1,39	FAND2 -1,55	FANC G -4,75	FEN1 3,02	GADD45 A -2,40	GADD45 G -62,50	H2AF X -1,30	HUS1 -2,09	LIG1 -27,05
D	MAPK1 2 1,79	MBD4 -1,28	MCPH 1 1,44	MDC1 -4,89	MLH1 -3,00	MLH3 -20,91	MPG- 4,62	MRE11A -1,44	MSH2 2,04	MSH3 -1,62	NBN -1,41	NTHL1 -7,73
E	OGG1 -4,86	PARP1 -6,47	PCNA -1,59	PMS1 2,73	PMS2 -1,98	PNKP -10,36	PPM1D 3,23	PPP1R15A 7,49	PRKDC -1,12	RAD1 1,12	RAD17 1,68	RAD18 -1,70
F	RAD21 -1,94	RAD50 1,15	RAD51 -1,41	RAD51B -2,25	RAD9 A -16,16	RBBP8 2,87	REV1 -2,70	RNF16B -3,94	RNF8 -2,38	RPA1 -7,14	SIRT1 -2,01	SMC1 A -5,31
G	SUMO1 -1,60	TOPBP1 -2,13	TP53 -8,00	TP53BP1 -1,13	TP73 -2,47	UNG 2,80	XPA -3,06	XPC-10,71	XRCC1 -13,21	XRCC 2 10,00	XRCC 3 -19,51	XRCC6 -8,84

4.2 RT-QPCR DOS GENES DE VIAS DE REPARO AO DANO DO DNA

4.2.1 SELEÇÃO DO GENE DE REFERÊNCIA

Utilizando o algoritmo NormFinder, foram analisados os genes de referência *ABL1*, *BCR* e *GUS β* nas amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e nas amostras do grupo controle. Em nossa análise, todos os genes analisados apresentaram valores de estabilidade inferiores a 0,15, valor de corte para validação da análise (Andersen et al, 2004). O gene que apresentou maior estabilidade entre os grupos foi o *ABL1* com estabilidade de 0,004, seguido pelo *GUS β* com 0,016 e por último o *BCR* com 0,021.

4.2.2 EXPRESSÃO DO GENE *GADD45G*

A expressão do gene *GADD45G* foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 0,26 (0,029 - 12,47), 0,18 (0,03 - 7,94) e 0,24 (0,09 - 0,61), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 13**, não houve diferença estatística significativa quando comparamos as amostras dos grupos LMC-FC com o grupo controle ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney), com *fold change* de 3,66 e nem quando comparados os grupos LMC-FC e LMC-CB ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney), com *fold change* de 0,78.

Figura 13: Gráfico da expressão do gene *GADD45G* dos grupos de pacientes LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico, e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,18, 0,26 e 0,24, respectivamente.

4.2.3 EXPRESSÃO DO GENE *ATM*

A expressão do gene *ATM* foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 7,34 (0,28 - 33,59), 1,84 (0,28 - 33,59) e 15,56 (5,28 - 24,93), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 14**, a expressão do gene *ATM* é menor nas amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico quando comparadas às do grupo controle, com *fold change* de 0,66, porém quando comparados aos do grupo LMC-CB, os pacientes do grupo LMC-FC ao diagnóstico apresentam maior expressão, com *fold change* de 1,34. Em ambos os casos houve diferença estatística significativa ($p = 0,002$ e $p = 0,031$ respectivamente, Teste Mann-Whitney).

Figura 14: Gráfico da expressão do gene *ATM* entre os grupos de pacientes LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e grupo controle, com medianas $2^{-\Delta Ct}$ de 1,84, 7,34 e 15,56, respectivamente.

4.2.4 EXPRESSÃO DO GENE *TP53*

A expressão do gene *TP53* foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 19,09 (1,00 - 120,26), 8,75 (2,06 - 45,25) e 19,97 (8,87 - 31,34), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 15**, a expressão do gene *TP53* é discretamente maior nos pacientes do grupo LMC-FC ao diagnóstico tanto quando comparados aos do grupo controle com *fold change* de 1,13, sem diferença estatística significativa ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney), quando comparadas às do grupo LMC-CB, as amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico apresentam um *fold change* de 1,58, com diferença estatística significativa ($p = 0,007$, Teste Mann-Whitney).

Figura 15: Gráfico da expressão do gene *TP53* entre os pacientes dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 8,75, 19,09 e 19,97, respectivamente.

4.2.5 EXPRESSÃO DO GENE *RAD9A*

A expressão do gene *RAD9A* foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 1,51 (0,22 - 12,82), 0,96 (0,18 - 8,46) e 0,97 (0,45 - 1,48), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 16**, a expressão do gene *RAD9A* é maior nos pacientes do grupo LMC-FC ao diagnóstico quando comparados às do grupo controle, com *fold change* de 1,71, porém sem diferença estatística significativa entre eles ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney). Já quando comparamos as amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico e LMC-CB a expressão é menor no primeiro grupo com *fold change* 0,75, também sem diferença estatística significativa ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney).

Figura 16: Gráfico da expressão do gene *RAD9A* dos pacientes dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 1,51, 0,96 e 0,97, respectivamente.

4.2.6 EXPRESSÃO DO GENE *ERCC1*

A expressão do gene *ERCC1* foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 9,06 (3,09 - 136,23), 22,32 (10,93 - 97,68) e 17,15 (9,85 - 26,35), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 17**, a expressão do gene *ERCC1* das amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico quando comparadas ao grupo controle apresentam um *fold change* de 1,00, com diferença estatística significativa ($p = 0,017$, Teste Mann-Whitney). Porém, quando comparados aos pacientes do grupo LMC-CB, os pacientes com LMC-FC ao diagnóstico apresentaram uma menor expressão do gene, com *fold change* de 0,65 e com diferença estatística significativa ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney).

Figura 17: Gráfico da expressão do gene *ERCC1* entre os grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 22,32, 9,06 e 17,15, respectivamente.

4.2.7 EXPRESSÃO DO GENE *LIG1*

A expressão do gene *LIG1* foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 1,79 (0,37 - 17,88), 2,03 (0,32 - 7,26) e 2,33 (1,41 - 3,84), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 18**, a expressão desse gene foi maior nos pacientes do grupo LMC-FC quando comparados tanto aos do grupo controle com *fold change* de 1,26 como aos do grupo LMC-CB com *fold change* de 1,23, não havendo diferença estatística significativa em ambos os casos ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney).

Figura 18: Gráfico da expressão do gene *LIG1* entre os grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 2,03, 1,79 e 2,33, respectivamente.

4.3 EXPRESSÃO DE MIRNAS

4.3.1 EXPRESSÃO MIR-17-5P

A expressão do miR-17-5p foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 1,10 (0,22 - 9,65), 0,50 (0,24 - 3,68) e 0,39 (0,14 - 0,53), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 19**, a expressão foi maior nas amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico quando comparados ao grupo Controle, com *fold change* de 4,29 e diferença estatística significativa ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney). O mesmo ocorreu quando comparamos as amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico com as do grupo LMC-CB, com *fold change* de 1,76 e com diferença estatística significativa ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney).

Figura 19: Gráfico da expressão do miR-17-5p dos pacientes dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,50, 1,10 e 0,39, respectivamente.

4.3.2 EXPRESSÃO MIR-34A

A expressão do miR-34a foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 0,0005 (0,00001 - 0,051), 0,042 (0,0022 - 0,133) e 0,0010 (0,00011 - 0,00048), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 20**, a expressão foi maior nas amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico quando comparados aos do grupo controle, com *fold change* de 4,33, porém sem diferença estatística significativa ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney). Entretanto, quando comparamos os pacientes do grupo LMC-FC ao diagnóstico com os do grupo LMC-CB, podemos observar que a expressão do miR-34a é menor nos pacientes do primeiro grupo, com *fold change* de 0,098 e diferença estatística significativa ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney).

Figura 20: Gráfico da expressão do miR-34a de pacientes com LMC crise blástica (CB), LMC-FC ao diagnóstico (FC) e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,042, 0,0005 e 0,001, respectivamente.

4.3.3 EXPRESSÃO DO MIR-150

A expressão do miR-150 foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 0,94 (0,060 - 9,32), 1,28 (0,11 - 25,11) e 6,50 (2,73 - 19,29), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 21**, a expressão desse miRNA foi menor nas amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico quando comparados ao grupo controle, com *fold change* de 0,22 e com diferença estatística significativa ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney). Já quando comparamos as amostras do grupo LMC-FC e LMC-CB, o primeiro também apresenta menor expressão com *fold change* de 0,37, todavia, sem diferença estatística significativa ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney).

Figura 21: Gráfico da expressão do miR-150 dos pacientes dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 1,28, 0,94 e 6,50, respectivamente.

4.3.4 EXPRESSÃO DO MIR-155

A expressão do miR-155 foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 0,05 (0,0033 - 0,17), 0,30 (0,11 - 0,82) e 0,09 (0,04 - 0,18), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 22**, a expressão desse miRNA foi menor nos pacientes do grupo LMC-FC ao diagnóstico quando comparados ao grupo controle com *fold change* de 0,84 e diferença estatística significativa ($p = 0,04$, Teste Mann-Whitney). Já quando comparamos os grupos LMC-FC ao diagnóstico e LMC-BC, o primeiro também apresenta menor expressão que o segundo, com *fold change* de 0,24 e com diferença estatística significativa ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney).

Figura 22: Gráfico da expressão do miR-155 das amostras dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,30, 0,05 e 0,09, respectivamente.

4.3.5 EXPRESSÃO DO MIR-221

A expressão do miR-221 foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 0,98 (0,31 - 7,46), 0,70 (0,15 - 1,96) e 0,50 (0,24 - 0,58), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 23**, a expressão desse miRNA foi maior nas amostras do grupo LMC-FC quando comparados às grupo controle, com *fold change* de 2,95 e com diferença estatística significativa ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney). Já quando comparamos as amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico e LMC-CB, o primeiro apresentou maior expressão com *fold change* de 1,82 e com diferença estatística significativa ($p = 0,006$, Teste Mann-Whitney).

Figura 23: Gráfico da expressão do miR-221 das amostras dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,70. 0,98 e 0,50, respectivamente.

4.3.6 EXPRESSÃO DO MIR-222

A expressão do miR-222 foi avaliada nas amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e controle, sendo que as medianas de $2^{-\Delta Ct}$ foram de 0,25 (0,035 – 4,50), 0,03 (0,00 – 0,76) e 0,20 (0,23 – 0,28), respectivamente. Como podemos observar na **Figura 24**, a expressão foi maior nas amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico quando comparados às do grupo controle com *fold change* de 2,45, porém sem diferença estatística significativa ($p = \text{NS}$, Teste Mann-Whitney). Já quando comparamos as amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico e LMC-CB a expressão do primeiro é maior com *fold change* de 4,07 e diferença estatística significativa ($p < 0,001$, Teste Mann-Whitney).

Figura 24: Gráfico da expressão do miR-222 das amostras dos grupos LMC-CB, LMC-FC ao diagnóstico e controle, com medianas de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,03, 0,25 e 0,20, respectivamente.

4.4 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE REPARO E MIRNAS

Após a análise da expressão dos genes de reparo, *GADD45G*, *ATM*, *TP53*, *RAD9A*, *ERCC1* e *LIG1*, e dos miRNAs, miR34a, miR-150, miR-155, miR-17-5p, miR-221 e miR-222, entre as amostras dos grupos LMC-FC ao diagnóstico, LMC-CB e Controle, realizamos a análise da expressão diferencial das amostras LMC-FC ao diagnóstico e LMC-CB, totalizando 75 amostras e como podemos observar na **Figura 25** as amostras foram segregadas de acordo com a expressão de cada gene e miRNA estudado, independentemente do grupo ao qual pertenciam. As amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico formaram dois subgrupos, um que apresentou progressão ao longo do monitoramento e o outro que não progrediu. Quando comparamos os dois subgrupos, podemos observar que as amostras do subgrupo com progressão apresentaram uma redução da expressão dos genes *GADD45G*, *ATM* e *TP53* quando comparadas ao subgrupo sem progressão, com *fold change* de 0,80, 0,53 e 0,80, respectivamente, sem diferença estatística significativa ($p=NS$), porém apresentaram aumento da expressão dos genes *RAD9A*, *ERCC1* e *LIG1* com *fold change* de 1,35, 1,70 e 1,55, respectivamente, sem diferença estatística significativa ($p = NS$). Já em relação a expressão dos miRNAs podemos observar um aumento de expressão dos miRNAs miR-34a, miR-150 e miR155, *fold change* de 5,17 ($p<0,000$), 1,41 ($p = NS$) e 1,90 ($p = 0,003$). Em relação à expressão do miR-17-5p, miR-221 e miR-222 podemos observar uma redução com *fold change* de 0,92, 0,91 e 0,96, respectivamente, todos sem diferença estatística significativa ($p = NS$). Os resultados da comparação desses subgrupos estão sumarizados na **Tabela 13**.

Ao analisarmos a expressão diferencial entre as amostras LMC-FC ao diagnóstico que apresentaram progressão e LMC-CB podemos observar que houve uma redução da expressão dos genes *ATM*, *GADD45G* e *RAD9A* com *fold change* de 0,76, 0,63 e 0,96, respectivamente, sem diferença estatística significativa ($p = NS$). Em relação ao gene *ERCC1* o *fold change* entre os dois subgrupos foi de 1,00, sem diferença estatística significativa ($p = NS$). Já os genes *TP53* e *LIG1*, apresentaram um aumento da expressão com *fold change* de 1,20 e 1,78, respectivamente, entre os subgrupos, porém sem diferença estatística significativa ($p = NS$).

Quanto a expressão diferencial dos miRNAs, as amostras do subgrupo que apresentou progressão apresentaram menor expressão do miR-150 e miR-155 com *fold change* 0,53, sem diferença estatística significativa ($p = NS$) e 0,42, com diferença estatística significativa ($p = 0,016$) respectivamente. Em contrapartida, observamos uma maior expressão do miR-17-5p, miR-34a, miR-221 e miR-222 com *fold change* de 1,60 com diferença estatística significativa

($p = 0,006$), 2,58 com diferença estatística significativa ($p = 0,046$), 1,60 diferença estatística significativa ($p = 0,031$) e 2,09 com diferença estatística significativa ($p = 0,015$), respectivamente. Os resultados dessa comparação estão sumarizados na **Tabela 14**.

Tabela 13: Expressão diferencial de 9 amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico de pacientes que progrediram e 49 não progrediram.

	<i>Fold change</i>	p
<i>ATM</i>	0,53	NS
<i>TP53</i>	0,74	NS
<i>GADD45G</i>	0,80	NS
<i>RAD9A</i>	1,35	NS
<i>ERCC1</i>	1,70	NS
<i>LIG1</i>	1,55	NS
miR-17-5p	0,92	NS
miR-34a	5,17	0,0002
miR-150	1,41	NS
miR-155	1,90	0,0035
miR-221	0,91	NS
miR-222	0,96	NS

Tabela 14: Expressão diferencial entre 9 pacientes com LMC-FC ao diagnóstico que progrediram e 17 LMC-CB.

	<i>Fold change</i>	p
<i>ATM</i>	0,76	NS
<i>TP53</i>	1,20	NS
<i>GADD45G</i>	0,63	NS
<i>RAD9A</i>	0,96	NS
<i>ERCC1</i>	1,00	NS
<i>LIG1</i>	1,78	NS
miR-17-5p	1,60	0,006
miR-34a	2,58	0,046
miR-150	0,53	NS
miR-155	0,42	0,016
miR-221	1,60	0,031
miR-222	2,09	0,015

Figura 25: Gráfico de expressão diferencial. Os pacientes foram segregados de acordo com a expressão dos respectivos genes e miRNAs estudados.

4.5 SOBREVIDA LIVRE DE EVENTOS

Os pacientes relacionados às amostras analisadas no presente estudo apresentaram uma mediana de tempo de acompanhamento de 13 anos. Quando correlacionamos a mediana de expressão dos genes de reparo e miRNAs das amostras com a ocorrência de eventos ao longo do tempo de acompanhamento, podemos observar que os genes *ERCC1* e o miR-155 apresentaram correlação.

Já a mediana de expressão do gene *ERCC1* foi de 8,06 nas amostras analisadas e como podemos observar na figura 26, os pacientes que apresentaram expressão desse gene acima da mediana, tiveram incidência de eventos mais precocemente quando comparados aos que apresentam expressão de *ERCC1* abaixo da mediana, com diferença estatística significativa, considerando-se 50% de sobrevida, com HR de 1,01 (95%CI 1-1,02; $p < 0,035$).

Em relação ao miR-155, a mediana de expressão das amostras foi de 0,068 e como podemos observar na Figura 27, os pacientes que apresentaram expressão acima da mediana, tiveram incidência de eventos mais precocemente quando comparados aos que apresentam expressão de miR-155 abaixo da mediana, com diferença estatística significativa, considerando-se 50% de sobrevida, com HR de 15,2 (95%CI 2,83-81,9; $p < 0,0015$).

Figura 26: Relação entre a expressão do gene *ERCC1* e a sobrevida livre de eventos, com mediana de expressão de 8,06.

Figura 27: Relação entre a expressão do miR-155 e a sobrevida livre de eventos, com mediana de expressão de 0,069.

4.6 EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO E A RESPOSTA MOLECULAR

Ao correlacionarmos a expressão dos genes de reparo avaliados com as respostas moleculares aos 3, 6 e 12 meses dos pacientes podemos observar que a expressão do gene *ATM* acima da mediana ($2^{-\Delta Ct} > 6,54$) apresentou correlação com as repostas aos 6 e 12 meses, com odds ratio (OR) de 3,8 (95%CI 0,78-20,1; $p < 0,08$) para a resposta molecular aos 3 meses; OR de 3,5 (95%CI 1,05–12,1, $p < 0,03$) para resposta molecular aos 6 meses e OR de 3,33 (95%CI 1,02-10,9, $p < 0,04$) para resposta molecular aos 12 meses.

4.7 EXPRESSÃO DOS MIRNAS E A RESPOSTA MOLECULAR

Ao correlacionarmos a expressão dos miRNAs avaliados com as respostas moleculares aos 3, 6 e 12 meses dos pacientes podemos observar que a expressão do miR-150 acima da mediana ($2^{-\Delta Ct} > 1,04$) apresentou correlação com as respostas aos 6 e 12 meses, com OR de 3,5 (95%CI 0,72-18,1; $p < 0,08$) para a resposta molecular aos 3 meses; OR de 5,72 (95%CI 1,5–22, $p < 0,007$) para resposta molecular aos 6 meses e OR de 3,33 (95%CI 1,02-10,9, $p < 0,04$) para resposta molecular aos 12 meses.

5. DISCUSSÃO

A introdução dos inibidores de tirosina quinase mudou profundamente o curso natural da LMC, reduzindo drasticamente o risco de progressão para a crise blástica, porém uma parcela dos pacientes progride mesmo com o tratamento sucessivo com diferentes drogas e o manejo desses pacientes continua sendo um grande desafio para os clínicos (SAUBELE; SILVER, 2015). Embora a proteína BCR-ABL1 seja o principal agente na patogênese da LMC, várias outras vias podem contribuir para a progressão da doença (MELO; BARNES, 2007).

O acúmulo de anormalidades cromossômicas e mutações é uma característica da progressão da LMC e são mais frequentes nos pacientes na crise blástica do que nos em fase crônica (LAHAYE; RIEHM; BERGER; PASCHKA *et al.*, 2005) e podem ocorrer tanto pelo aumento da taxa de dano ao DNA como pela alteração das vias de reparo, levando as células a um quadro de instabilidade genética (SKORSKI, 2007).

Neste trabalho tivemos como objetivo avaliar a expressão de genes e miRNAs envolvidos nos mecanismos de reparo e se estes possuem algum valor como marcador preditivo tanto para a progressão da fase crônica para a crise blástica e/ou como marcador de resposta ao tratamento com ITQ.

Dos 17 pacientes do grupo LMC-CB, 82,3% (14/17) foram a óbito, 65% (11/17) apresentaram algum tipo alteração genética: 54,5% (6/11) com mutações do domínio tirosina quinase do BCR-ABL1, sendo que 33,3% (2/6) apresentaram 2 mutações simultaneamente devido a troca de inibidor decorrente da resistência ao imatinibe. As mutações encontradas foram: F317L; F359V; F330, T315I e as duplas mutações T315I/F317L e F317L/F359V. Além disso, 35% (6/17) apresentaram alterações cromossômicas adicionais (ACAs) como a seguir: t(3;21); duplo Ph com del(3)(p13p23) e com trissomia do cromossomo 8; trissomia do cromossomo 10 e t(15;21); t(9;22;11;22)(q34;q25;q22;q11); 21q+ e del(22)(q11) e por último trissomia dos cromossomos 5, 6, 8 e 21. Apenas 9% (1/11) paciente apresentaram simultaneamente, mutação do domínio tirosina quinase e ACAs.

A partir do ensaio do RT² PROFILER PCR ARRAY foram selecionados os genes *GADD45G*, *ATM*, *TP53*, *RAD9A*, *ERCC1* e *LIG1*, pois apresentaram maior redução de expressão e por isso poderiam estar relacionados com a progressão da LMC para a crise blástica, porém nem todos os resultados não foram replicados quando avaliamos a expressão deles na nossa coorte. Essa diferença de resultados se deve principalmente ao viés analítico e

estatístico em ensaios realizados com pequeno número de amostras, por isso a necessidade de validação em uma coorte maior.

Além disso, podemos observar, através da análise do gráfico de expressão diferencial, que os genes *ATM*, *TP53* e *ERCC1* e dos miRNAs miR-34a e miR-155 podem estar envolvidos na progressão da LMC da fase crônica para a crise blástica já que a expressão destes segregaram as amostras em 3 grupos distintos: amostras de pacientes com LMC-FC a diagnóstico que não apresentaram progressão, pacientes com LMC-FC ao diagnóstico que apresentaram progressão e amostras de pacientes com LMC-CB, como discutiremos mais abaixo.

O gene *GADD45G* (Growth Arrest and DNA-damage-induced 45 gamma) é um membro da família *GADD45*, composta pelo *GADD45A*, *GADD45B* e *GADD45G*. Este gene codifica uma proteína responsiva ao estresse que está envolvida na resposta ao dano do DNA e com a parada do ciclo celular através da modulação de várias proteínas celulares como PCNA, CDKN1A, CDK1, CDC2/ciclina B1, p38 e JNK. Em tumores sólidos, o *GADD45G*, muitas vezes, apresenta uma redução de expressão, contribuindo para a persistência do ciclo celular e promovendo o crescimento tumoral (XU; ZHANG; MA; QIAN *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que não houve diferença de expressão do gene *GADD45G* entre os grupos avaliados e que não existe correlação da expressão deste gene com a progressão da LMC. Da mesma forma, em estudo conduzido por Radich e cols, foram realizados ensaios de expressão gênica pela técnica de *microarray* para determinar quais genes poderiam estar associados com a progressão da LMC. A princípio o gene *GADD45G* surgiu como um dos possíveis genes a estarem relacionados, porém ao corrigirem o resultado obtido, subtraindo-se a expressão das células CD34+ normais, não foi encontrada associação entre a expressão do gene *GADD45G* e a progressão da LMC para as fases mais avançadas (RADICH; DAI; MAO; OEHLER *et al.*, 2006).

O gene *ATM* tem papel crucial na resposta ao dano do DNA, além de muitas funções, incluindo o reconhecimento e reparo de DSB. A resposta ao dano do DNA inclui o reconhecimento do dano, o recrutamento de proteínas de reparo, sinalização para a parada de ciclo celular e a facilitação da apoptose. Desde que este gene está envolvido em vários desses processos, ele pode ser considerado o principal regulador da resposta ao dano ao DNA (ESTIAR; MEHDIPOUR, 2018).

Como podemos observar em nossos resultados, o gene *ATM* apresentou menor expressão nas amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico, mas ainda menos expresso nos pacientes com LMC-CB.

Em estudo recente conduzido por Popp e cols comparando células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em fase crônica com RMM, com perda de RMM, com LMC-FC *de novo* e LMC-CB demonstrou, por imunofluorescência, que as células de pacientes com LMC-FC *de novo* e LMC-CB apresentavam maior taxa de dano ao DNA e, através da técnica de Western Blot, que tanto as células de LMC-FC *de novo* e LMC-CB não expressavam a proteína ATM e p-ATM e nem a CHK2 e p-CHK2 (POPP; KOHL; NAUMANN; FLACH *et al.*, 2020).

Outro estudo, conduzido por Takagi e cols, demonstrou que células progenitoras hematopoiéticas BCR-ABL1 positivas de camundongos com haploinsuficiência do gene *ATM* geram uma taxa maior de ciclos quebra – fusão - ponte do que as células controle BCR-ABL1 positivas com o gene *ATM* selvagem (TAKAGI; SATO; PIAO; MIYAMOTO *et al.*, 2013). O mecanismo ciclo quebra-fusão-ponte ocorre quando um cromossomo perde o telômero por conta de quebra de dupla fita e as cromátides irmãs sem telômeros formam um cromossomo dicêntrico e então, durante a anáfase os dois centrômeros são separados em núcleos diferentes, levando a uma possível quebra do cromossomo dicêntrico. A quebra levará, após a replicação, a novas extremidades sem telômeros de forma que essas extremidades formarão um novo cromossomo dicêntrico e desta forma fica estabelecido um ciclo (HASTINGS; LUPSKI; ROSENBERG; IRA, 2009). Assim, BCR-ABL1 é capaz de gerar maior instabilidade genética na presença de haploinsuficiência de *ATM* (TAKAGI; SATO; PIAO; MIYAMOTO *et al.*, 2013).

Desta forma a menor expressão do gene *ATM* encontrada nas amostras de pacientes em crise blástica pode ser devido à haploinsuficiência o que pode acarretar maior taxa de dano ao DNA e maior taxa de ciclos quebra – fusão – ponte, levando a ACAs como nos 6 pacientes em crise blástica do nosso estudo. Quando observamos a expressão diferencial (**Figura 25**) e comparamos os pacientes LMC-FC sem progressão com os que progrediram, houve uma menor expressão do gene ATM (*fold change* 0,6; p = NS).

Além disso, que a expressão do gene *ATM* acima da mediana nas amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico mostrou uma correlação com as respostas moleculares aos 6 e 12 meses, ou seja, os pacientes que apresentam maior expressão do gene *ATM*

possuem maior chance de atingirem a resposta ótima ao tratamento, podendo ser utilizado como um marcador preditivo.

Outro gene com função crucial na orquestração da resposta ao dano do DNA é o *TP53* que frente ao dano leva a parada do ciclo celular ou a apoptose, dependendo da dimensão do dano (JUNTILA; EVAN, 2009). A cascata de efeitos da ativação do *TP53* se deve principalmente a sua ação como fator de transcrição regulando a expressão de uma série de outros genes (MENENDEZ; INGA; RESNICK, 2009). O efeito celular do *TP53* é parcialmente mediado por sua habilidade de aumentar a expressão de genes antiproliferativos e pró-apoptóticos, como *CDKN1A* (parada do ciclo celular na fase G1); *SFN* (parada do ciclo celular na fase G2) e *PUMA* (apoptose). O *TP53* também pode diminuir a expressão de vários genes, inclusive aqueles envolvidos na regulação da proliferação celular e apoptose (MURPHY; AHN; WALKER; HOFFMAN *et al.*, 1999). Em outras palavras, a resposta transcricional do gene *TP53* envolve ativação e repressão de dezenas de genes. Além dos efeitos diretos do *TP53* em promotores de genes codificantes, ele também tem sido implicado na modulação de miRNAs (NAVARRO; LIEBERMAN, 2015).

Em nossos resultados podemos observar que as amostras de pacientes em crise blástica apresentam menor expressão do gene *TP53*, quando comparadas às de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico, o que pode contribuir para uma maior instabilidade genética, já que a cascata de sinalização e a modulação da resposta ao dano do DNA podem estar comprometidas.

Feinstein e cols mostraram que cerca de 30% de pacientes em crise blástica apresentavam a perda de um dos alelos do gene *TP53*, o que levava a um menor, ou nulo, nível de transcrição (FEINSTEIN; CIMINO; GALE; ALIMENA *et al.*, 1991).

Em outro estudo, Honda et cols observaram que camundongos transgênicos que expressavam BCR-ABL1 e com haploinsuficiência do gene *TP53* morreram mais precocemente que os controles e que estes apresentaram uma rápida proliferação de células blásticas com sinais semelhantes à LMC humana. As células blásticas eram clonais e expressavam BCR-ABLp210. Desta forma, este estudo mostrou que a perda de *TP53* contribui para a transformação de células que expressam p210 (HONDA; USHIJIMA; WAKAZONO; ODA *et al.*, 2000). Desta forma a menor expressão do gene *TP53* encontrada nos pacientes em crise blástica pode ser devido à haploinsuficiência prejudicando a sinalização de reparo ao dano do DNA e perpetuando células com mutações ou outras alterações.

O gene *RAD9A* (*RAD9* checkpoint clamp component A) é um gene conhecido pelo seu papel na resposta e repato ao dano do DNA, como parte do complexo RAD9A-HUS-1-RAD1. Ele age como sensor do dano ao DNA e permite que a ATR quinase fosforile seu efetor CHK1 (LIEBERMAN; BERNSTOCK; BROUSTAS; HOPKINS *et al.*, 2011).

Nowicki e cols mostraram em estudo que comparava a expressão gênica de células de medula óssea de pacientes com LMC-FC e LMC-CB que a expressão de *RAD9A* encontrava-se reduzida na última (NOWICKI; PAWLOWSKI; FISCHER; HESS *et al.*, 2003). Já em nosso estudo não houve diferença da expressão de RAD9A entre os grupos avaliados, provavelmente pelo fato de que, no presente estudo, este gene ter sido avaliado em sangue periférico e não na medula óssea.

O gene *ERCC1* (Excision Repair Cross Complementing – Group1) faz parte de um heterodímero com atividade endonuclease que participa tanto do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo, mas também participa do mecanismo de reparo por anelamento de fita simples (AFS) (MOTYCKA; BESSHO; POST; SUNG *et al.*, 2004), assim a maior expressão de *ERCC1* está associado a uma maior taxa de AFS (BAVARO; MARTELLI; CAVO; SOVERINI, 2019).

O AFS é uma via de reparo de quebra de dupla fita, de baixa acurácia, que utiliza repetições homólogas para ligar as extremidades do DNA e causa uma deleção entre as repetições, podendo aumentar a taxa de mutagenicidade (BHARGAVA; ONYANGO; STARK, 2016).

No presente estudo, a expressão do gene *ERCC1* foi maior nas amostras de pacientes em crise blástica, quando comparadas às amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico e como podemos observar, são os pacientes em crise que blástica que apresentam maior número de ACAs que podem ocorrer pelo aumento de AFS. Quando analisamos o gráfico de expressão diferencial (**Figura 25**), podemos observar que os pacientes com LMC-FC com progressão apresentaram maior expressão de *ERCC1* quando comparados aos que não apresentaram progressão (*fold change* 1,74; *p* = NS). Já quando comparamos os subgrupos LMC-FC com progressão e LMC-CB não observamos diferença da expressão do gene (*fold change* 1,0; *p* = NS). Além disso, a expressão de *ERCC1* acima da mediana mostrou correlação com uma pior sobrevida livre de eventos, tais como não atingir a RMM aos 12 meses, troca de ITQ para segunda geração, progressão da doença ou óbito.

Deleções intra-cromossômicas submicroscópicas em regiões com alta densidade de sequências Alu foram detectadas em leucemias BCR-ABL1 positivas, implicando em AFS. A

análise foi realizada em 250 pacientes com LMC, utilizando a técnica de FISH, e 9,2% dos pacientes apresentaram deleções (KOLOMIETZ; AL-MAGHRABI; BRENNAN; KARASKOVA *et al.*, 2001).

Cramer e cols também demonstraram que a atividade AFS é dependente de BCR-ABL1. Em células BCR-ABL1 positivas selvagens e com mutação do domínio quinase T315I, após o tratamento com imatinibe, a atividade AFS voltou aos patamares basais nas células selvagens, enquanto nas células T315I a atividade continuou alta. Porém não foi observado aumento de expressão do gene *ERCC1*, apenas alteração de localização da proteína, que nas células BCR-ABL1 positivas selvagens estariam localizadas no núcleo ao invés do citoplasma, sugerindo uma alteração funcional (CRAMER; NIEBOROWSKA-SKORSKA; KOPTYRA; SLUPIANEK *et al.*, 2008).

Assim, a maior expressão do gene *ERCC1* observada nos pacientes em crise blástica pode estar relacionada com a maior atividade de AFS e, por conseguinte, com o surgimento de ACAs, características da crise blástica.

O gene *LIG1* (Ligase 1) é necessário para a junção de fitas de DNA no mecanismo de reparo de junção alternativo, mecanismo este relacionado com a formação de translocações (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013). As ligases catalizam a formação das ligações fosfodiéster para unir as fitas de DNA rompidas, ligando preferencialmente junções com micro-homologias mais longas (LU; DUAN; SHU; WANG *et al.*, 2016).

Não existem estudos que relacionem a expressão do gene *LIG1* com a progressão da LMC e nossos resultados mostram que não houve diferença na expressão desse gene entre os grupos estudados.

Além dos genes de reparo, também avaliamos a expressão dos miRNAs miR-17-5p, miR-34a, miR-150, miR-155, miR-221 e miR-222.

O miR17-5p faz parte do miR17-92 que é policistronico e está localizado no cromossomo 13q31 e também inclui os miR-17-3p, miR-19a, miR-18a, miR-19b, miR-20a e miR-91-1, sendo que o miR17-5p possui um papel importante dentro do *cluster* e está altamente expresso em vários tipos de câncer e além disso, a maior expressão deste miRNA possui um valor de pior prognóstico (KONG; CHENG; LIANG; CHEN *et al.*, 2018).

Segundo estudo de Cloonan e cols., o miR-17-5p pode ter um papel tanto como supressor de tumor como de um oncogene, dependendo do cenário celular. No cenário em que prevalecem genes pro-proliferativos, a supressão de alvos anti-proliferativos é reforçada pela remoção dos sinais auto-regulatórios e aumento da supressão por reguladores pro-

proliferativos, sendo que esses sinais combinados formam uma rede proliferativa e desta forma o miR-17-5p tem um papel oncogênico. Já quando o cenário tem uma predominância de genes anti-proliferativos, a supressão de genes pro-proliferativos é reforçada, formando uma rede de sinais anti-proliferativos, desta forma, o papel do miR-17-5p é de supressor de tumor. Neste último cenário, a remoção do miR-17-5p pode resultar em um sinal pro-proliferativo. O miR-17-5p tem como alvos RNAs mensageiros de importantes proteínas que regulam a proliferação celular, tais como, inibidores da proliferação celular CDKN1A, E2F1, STAT3, MAPK9, PTEN e BCL2L1 e as promotoras de proliferação celular, NMYC, CRK, GAB1 e HIF1A entre outras (CLOONAN; BROWN; STEPTOE; WANI *et al.*, 2008).

Os resultados observados no presente estudo mostraram que apesar das amostras do grupo LMC-FC ao diagnóstico e LMC-CB apresentarem expressão do miR-17-5p maior do que os controles normais, a expressão nas amostras do grupo LMC-FC é maior do que nas amostras LMC-CB.

Venturini e cols., utilizando linhagens BCR-ABL1 positivas como K562, LAMA-84 e EM2 tratadas com imatinibe (1µM por 24 horas) ou transfectadas com RNA de silenciamento anti-*BCR-ABL*, observaram que a expressão do miR17-5p foi reduzida em 2 vezes, mostrando que a expressão desse miRNA é dependente de BCR-ABL1. Além disso, também demonstrou que a expressão do miR-17-5p é maior em células CD34+ de pacientes com LMC em fase crônica, mas não nas de crise blástica quando comparadas às células CD34+ normais (VENTURINI; BATTMER; CASTOLDI; SCHULTHEIS *et al.*, 2007). Na análise de expressão diferencial não houve diferença entre os subgrupos LMC-FC sem e com progressão, porém, o subgrupo LMC-FC com progressão apresentou maior expressão que o grupo LMC-CB (fold change 1,71; p = 0,006), o que vai de encontro com os estudos de Venturini e cols.

Importante ressaltar que, apesar da importância do miR-17-5p na modulação da atividade proliferativa e diferentemente dos estudos relacionados a tumores sólidos, não encontramos nenhuma correlação da expressão do miR-17-5p, seja com a sobrevida livre de eventos ou com as respostas moleculares aos 3, 6 e 12 meses.

O miR-34a está localizado no cromossomo 1p36 e faz parte de uma família que conta também com o miR-34b e miR-34c e apesar das semelhanças o miR-34a é que tem sido relacionado com pior prognóstico em tumores sólidos já que pode apresentar menor expressão por conta de deleção cromossômica ou metilação de seu promotor (HERMEKING, 2009). Este miRNA ganhou importância pela sua ação na rede de sinalização do gene *TP53*. Em

estudo realizado por Navarro e Liebermann, ficou demonstrado que o miR-34a possui uma rede de sinalização bastante complexa e dependente do tipo celular. Eles demonstraram ainda que o miR-34a tem como alvo direto o gene *TP53* mas que, além disso, o miR34a também pode ativar a transcrição do gene *TP 53*, o gene *CDKN1*, *PUMA* e *BAX* e inibindo a transcrição os genes *MDM4*, *SIRT1* e *YY1*, estabilizando assim a resposta do gene *TP53* (NAVARRO; LIEBERMAN, 2015). Porém de acordo com estudo de Concepcion e cols. realizado com camundongos deficientes em miR-34a e utilizando as técnicas de RT-qPCR e Western Blot, foi observado que o miR-34a não é essencial para a resposta do gene *TP53*, existindo um mecanismo independente de miR-34a (CONCEPCION; HAN; MU; BONETTI *et al.*, 2012).

Avaliamos, em nosso estudo, a expressão do miR-34a e do gene *TP53* através da técnica de RT-qPCR, sendo que nas amostras de pacientes em crise blástica a expressão do miR-34a é maior quando comparados às amostras de pacientes LMC-FC ao diagnóstico. Além disso, a expressão do gene *TP53* é menor nas amostras de pacientes com LMC-CB quando comparados às amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico e neste caso, talvez a maior expressão do miR-34a esteja inibindo a atividade do gene *TP53*, e seus alvos PUMA e BAX, inibindo assim a parada do ciclo celular e apoptose, contribuindo desta forma para uma maior instabilidade genética. Os dados da análise de expressão diferencial mostrou que a expressão do miR-34a dos pacientes com LMC-FC com progressão foi maior do que nos que não progrediram (*fold change* 3,08; $p = 0,003$) e menor do que na LMC-CB (*fold change* 0,23; $p = 0,007$), desta forma, estes achados podem identificar quais pacientes ao diagnóstico podem progredir.

O miR-150 está localizado no cromossomo 19q13.33 e é um dos miRNAs mais bem estabelecidos na LMC, tanto como marcador de prognóstico de doença como de resposta ao tratamento. Ele é expresso diferencialmente nos estágios da hematopoiese e frequentemente sua expressão encontra-se alterada em diversas doenças hematológicas. (HE, JIANG, CHENG, 2014)

Nos ensaios realizados neste estudo, as amostras de pacientes com LMC- FC ao diagnóstico apresentaram menor expressão do miR-150 quando comparadas às amostras de doadores saudáveis. Da mesma forma, Srutova e cols também observaram que amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico apresentavam expressão de miR-150 reduzida quando comparadas a amostras de doadores saudáveis e propôs um novo mecanismo que explicaria esse resultado. Nesse mecanismo a oncoproteína MYC, sob ação da proteína BCR-ABL1 se

ligaria ao miR-150, inibindo sua ação sobre MYB que passaria então a exercer sua cascata de sinalização inibindo a parada de ciclo celular e a apoptose (SRUTOVA; CURIK; BURDA; SAVVULIDI *et al.*, 2018).

Fang e cols também avaliaram a expressão do miR-150 em amostras de pacientes com LMC ao diagnóstico e doadores saudáveis e observaram que os níveis estavam reduzidos nos pacientes com LMC quando comparadas aos doadores normais. Além disso, mostrou que em células K562 transfectadas com miR-150 havia a supressão do crescimento celular e induzia a apoptose. Isso se deve principalmente ao gene EIF4 (Fator Iniciador de Tradução E4) que é alvo do miR-150. EIF4 é regulado pelas vias RAS/MAPK e PI3K/mTOR, sendo fosforilado por ambas as vias (FANG; WANG; ZHAO; LIN *et al.*, 2016). Quando fosforilado EIF4 liga-se avidamente a complexos ribossômicos que contenham eIF3 e que, geralmente, são mRNAs que controlam proliferação, como *CDC25C*, *C-MYC* e *ODC*, e sobrevida, como *BCL-2* e *XIAP* (SHAHBAZIAN; PARSYAN; PETROULAKIS; HERSHEY *et al.*, 2010).

Como podemos observar em nossos resultados, não houve diferença na expressão do miR-150 entre as amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico e LMC-CB e também não foi observada correlação com a sobrevida livre de eventos, desta forma a expressão de miR-150 pode não estar envolvida na progressão da LMC fase crônica para a crise blástica mas apesar disso, houve correlação com a resposta molecular ao tratamento aos 6 e 12 meses e desta forma pode ser utilizado como um marcador preditivo de resposta ao tratamento com ITQ ao diagnóstico.

O miR-155 está localizado no cromossomo 21q21.3 e como outros miRNAs está envolvido na hematopoiese normal, sendo expresso em altos níveis nas células progenitoras hematopoiéticas e em baixos níveis nas células hematopoiéticas maduras, mantendo os genes que especificam a diferenciação sob controle até que o processo termine (GEORGANTAS; HILDRETH; MORISOT; ALDER *et al.*, 2007). Além disso, é um dos miRNAs que apresenta maior alteração de expressão tanto em tumores sólidos como nas doenças hematológicas e pode ter tanto um efeito oncogênico como supressor de tumor, dependendo o tipo de tecido e do tipo de doença (HIGGS; SLACK, 2013). Em nossos ensaios observamos que as amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico apresentaram menor expressão de miR-155 quando comparados tanto às amostras de doadores normais como às de pacientes em crise blástica. Em estudo conduzido por Rokah e cols, também ficou demonstrado que o miR-155 é menos expresso tanto em amostras de pacientes com LMC recém diagnosticados em relação a doadores saudáveis e após 30 dias de tratamento com ITQ, a expressão do miR-155 de

amostras de pacientes com LMC passou a ser comparável à de doadores saudáveis. Além disso, através de análise de predição de alvo, demonstrou que o gene *CBL* é alvo direto do miR-155, portanto o gene *CBL* estaria mais expresso na ausência do miR-155 (ROKAH; GRANOT; OVCHARENKO; MODAI *et al.*, 2012). O gene *CBL* está envolvido no processo de iniciação e progressão tumoral e foi descoberto como oncogene que induz leucemias tanto de células B como mieloides (LANGDON; HARTLEY; KLINKEN; RUSCETTI *et al.*, 1989).

A crise blástica da LMC é biologicamente complexa e similar às leucemias hiperproliferativas agudas, sendo que a transformação pode ser tanto da linhagem mieloide, como linfóide ou indiferenciada (BURKE; CARROLL, 2010).

Como observamos em nossos resultados, as amostras de pacientes em crise blástica apresentaram maior expressão do miR-155. O'Connell e cols demonstraram que a maior expressão de miR-155 em células progenitoras hematopoiéticas de camundongos levou a uma mieloproliferação com características pré-leucêmicas, além disso, também observaram uma redução das contagens de hemácias, plaquetas e redução de hemoglobina nos camundongos. Outro estudo do mesmo grupo mostrou que *SHIP1* (Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase) é um alvo direto do miR-155. *SHIP1* é um regulador negativo de AKT, uma proteína da via de sinalização PI3K, desta forma, o aumento da expressão de miR-155 observado nas amostras de pacientes com LMC-CB reduz a expressão de *SHIP1* e potencializa a via PI3K-AKT, reduzindo a apoptose e aumentando a sobrevivência celular (O'CONNELL; CHAUDHURI; RAO; BALTIMORE, 2009).

Em outro estudo de Costinean e cols. ficou demonstrado que camundongos transgênicos que expressavam altos níveis miR-155, desenvolveram leucemia linfoblástica aguda (LLA) e determinaram que além da redução da expressão de *SHIP1*, ocorria também a redução na expressão *C/EBPβ* (CCAAT enhancer-binding protein β), um importante regulador da sinalização de IL6 e desta forma, reduzindo a diferenciação celular e aumentando a proliferação de células precursoras. Assim, os mecanismos mediados pela maior expressão do miR-155 tanto através de *SHIP1* como *C/EBPβ* mostram o seu potencial oncogênico (COSTINEAN; SANDHU; PEDERSEN; TILI *et al.*, 2009).

Além dos estudos em leucemias, estudos *in vivo* e *in vitro* com camundongos mostraram que a maior expressão de miR-155 promove instabilidade genética pela redução da expressão da polimerase delta de alta fidelidade e dos fatores MLH1, MSH2 e MSH6, aumentando a taxa de mutagenicidade (CZOCHOR; SULKOWSKI; GLAZER, 2016);

(VALERI; GASPARINI; FABBRI; BRACONI *et al.*, 2010) e (TILI; MICHAÏLLE; WERNICKE; ALDER *et al.*, 2011) já que esses fatores são fundamentais para o sistema de reparo de pareamento incompatível (REYES; SCHMIDT; KOLODNER; HOMBAUER, 2015).

Assim, a maior expressão de miR-155 observada nos pacientes em crise blástica pode estar relacionada tanto com a fisiopatologia da LMC pela sua ação sobre *SHIP1* e *C/EBP β* como também pela sua ação sobre *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* já que 6 pacientes apresentavam mutações do domínio tirosina quinase, inclusive com duplas mutações.

A expressão do miR-155 também mostrou correlação com a sobrevida livre de eventos, sendo que os pacientes cujas amostras apresentaram expressão acima da mediana tiveram ocorrência de eventos, tais como não atingir a RMM aos 12 meses, troca de ITQ para segunda geração, progressão da doença ou óbito, mais precocemente, ou seja, um cenário pouco promissor. Além disso, quando analisamos o gráfico de expressão diferencial (**Figura 25**), a expressão do miR-155 entre as amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico, podemos observar que os pacientes que evoluíram para fases mais avançadas da doença apresentaram maior expressão de miR-155 quando comparados aos que não progrediram (*fold change* 2,32; $p = 0,006$) e menor que os pacientes do grupo LMC-CB (*fold change* 0,39 $p = 0,009$) e desta forma, podendo sugerir que pacientes com LMC-FC ao diagnóstico com maior expressão de miR-155 são pacientes que podem evoluir para fases mais avançadas da LMC ou apresentar alterações genéticas.

O miR-221 e o miR-222 estão localizados no cromossomo Xp11.3 e estão amplamente distribuídos entre organismos eucariotos e são relacionados com a patogênese de diferentes tipos de tumores como de fígado, coloretal, cervical e também com algumas leucemias, especialmente com a LLA. Além disso, são codificados *in tandem*, transcritos concomitantemente e compartilham homologia nas suas sequências, sendo muitas vezes denotados como miR-221/222 (SONG; AN; NIU; LU *et al.*, 2019).

No presente estudo, a expressão do miR-221 foi maior nas amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico quando comparadas tanto às do grupo controle e como às do grupo LMC-CB. Já o miR-222 apresentou maior expressão nas amostras de pacientes com LMC-FC ao diagnóstico quando comparadas às de pacientes com LMC-CB.

Em estudo conduzido por Machová e cols, utilizando ensaios de *microarray*, ficou demonstrado que a expressão do miR-221 foi maior no *pool* de pacientes em crise blástica quando comparados aos controles que neste caso foram pacientes com LMC- FC

(MACHOVÁ POLÁKOVÁ; LOPOTOVÁ; KLAMOVÁ; BURDA *et al.*, 2011). Já em nosso estudo, tanto o miR-221 como o miR-222 apresentaram maior expressão nas amostras de pacientes com LMC-FC quando comparados às de pacientes com LMC-CB. Não há muitos estudos em LMC, principalmente fase crônica, que relacione a expressão do miR-221/222. Jiang e cols reportou que pacientes com LMC-FC não tratados apresentaram maior expressão do miR-221 ao diagnóstico e em pacientes que respondem ao tratamento e que isso se deve a STAT5 ser alvo direto do miR-221. Este mesmo estudo demonstrou a baixa expressão de miR-221 pode estar relacionada com a resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe e aumento da expressão de STAT5 (JIANG; CHENG; HU; ZHANG *et al.*, 2019). No presente estudo os pacientes do subgrupo LMC-FC com progressão ao diagnóstico apresentaram maior expressão do miR-221 quando comparados com as suas amostras na LMC-CB (**Anexo 2**), podendo sugerir que nestes pacientes a progressão ocorreu pela redução da expressão de miR-221 levando a uma maior resistência ao tratamento.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos em nosso trabalho podemos concluir que diferentes vias do mecanismo de reparo de dano ao DNA estão envolvidas na progressão da LMC, contribuindo para o acúmulo de alterações genéticas. Genes importantes na sinalização das vias de reparo bem como miRNAs apresentaram níveis de expressão alterados e contribuem para a instabilidade genética das células de pacientes com LMC em crise blástica. Genes como *ATM* e *TP53* apresentaram menor expressão, o que pode levar a inibição da parada celular e da apoptose, perpetuando células com mutações e ACAs. Além disso, a expressão do gene *ERCC1*, envolvido no mecanismo de AFS e de baixa acurácia, aumenta a ocorrência, principalmente de ACAs e mostrou ser importante para a sobrevida livre de eventos. Além disso, a expressão do gene *ATM* mostrou correlação com a resposta molecular ao tratamento aos 6 e 12 meses, favorecendo atingir a resposta ótima ao tratamento, assim como o miR-150.

Além disso, podemos concluir que o miR-17-5p, miR-34a, e miR-155 quando mais expressos, apresentam relação com a progressão da doença, sendo que a expressão do miR-34a e miR-155 podem ser utilizados como marcadores ao diagnóstico de quem poderá progredir para fases mais avançadas da doença. Ainda, a expressão de miR-155 também mostrou ser importante para a sobrevida livre de eventos. Em relação ao miR-221/222 também podem estar envolvidos na progressão porém causando resistência ao tratamento com ITQ com consequente perda de resposta ótima.

Mais estudos são necessários, especialmente para correlacionar a expressão dos miRNAs tanto com a progressão da LMC para fases mais avançadas como com a resposta ao tratamento daqueles pacientes que não atingem os marcos de resposta ótima preconizados pelo European Leukemia Net.

7. REFERÊNCIAS

- AGIRRE, X.; JIMÉNEZ-VELASCO, A.; SAN JOSÉ-ENÉRIZ, E.; GARATE, L. *et al.* Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. **Mol Cancer Res**, 6, n. 12, p. 1830-1840, Dec 2008.
- BACCARANI, M.; SAGLIO, G.; GOLDMAN, J.; HOCHHAUS, A. *et al.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, 108, n. 6, p. 1809-1820, Sep 2006.
- BAVARO, L.; MARTELLI, M.; CAVO, M.; SOVERINI, S. Mechanisms of Disease Progression and Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukemia: An Update. **Int J Mol Sci**, 20, n. 24, Dec 2019.
- BAŚKIEWICZ-MASIUK, M.; MACHALIŃSKI, B. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. **Eur J Haematol**, 72, n. 6, p. 420-429, Jun 2004.
- BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M.; GAREWAL, H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. **Mutat Res**, 511, n. 2, p. 145-178, Jun 2002.
- BHARGAVA, R.; ONYANGO, D. O.; STARK, J. M. Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. **Trends Genet**, 32, n. 9, p. 566-575, 09 2016.
- BOWMAN, T.; GARCIA, R.; TURKSON, J.; JOVE, R. STATs in oncogenesis. **Oncogene**, 19, n. 21, p. 2474-2488, May 2000.
- BUENO, M. J.; PÉREZ DE CASTRO, I.; GÓMEZ DE CEDRÓN, M.; SANTOS, J. *et al.* Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. **Cancer Cell**, 13, n. 6, p. 496-506, Jun 2008.
- BUNTING, S. F.; NUSSENZWEIG, A. End-joining, translocations and cancer. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 7, p. 443-454, Jul 2013.
- BURCHERT, A.; WANG, Y.; CAI, D.; VON BUBNOFF, N. *et al.* Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. **Leukemia**, 19, n. 10, p. 1774-1782, Oct 2005.
- BURKE, B. A.; CARROLL, M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia**, 24, n. 6, p. 1105-1112, Jun 2010.
- CALABRETTA, B.; PERROTTI, D. The biology of CML blast crisis. **Blood**, 103, n. 11, p. 4010-4022, Jun 2004.
- CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer**, 6, n. 11, p. 857-866, Nov 2006.
- CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A. D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. **Trends Cell Biol**, 26, n. 1, p. 52-64, Jan 2016.

- CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environ Mol Mutagen**, 58, n. 5, p. 235-263, 06 2017.
- CLOONAN, N.; BROWN, M. K.; STEPTOE, A. L.; WANI, S. *et al.* The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. **Genome Biol**, 9, n. 8, p. R127, 2008.
- CONCEPCION, C. P.; HAN, Y. C.; MU, P.; BONETTI, C. *et al.* Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice. **PLoS Genet**, 8, n. 7, p. e1002797, 2012.
- COPPO, P.; FLAMANT, S.; DE MAS, V.; JARRIER, P. *et al.* BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. **Br J Haematol**, 134, n. 2, p. 171-179, Jul 2006.
- CORTES, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, 18, n. 3, p. 569-584, viii, Jun 2004.
- CORTEZ, D.; KADLEC, L.; PENDERGAST, A. M. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. **Mol Cell Biol**, 15, n. 10, p. 5531-5541, Oct 1995.
- COSTINEAN, S.; SANDHU, S. K.; PEDERSEN, I. M.; TILI, E. *et al.* Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. **Blood**, 114, n. 7, p. 1374-1382, Aug 2009.
- CRAMER, K.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; KOPTYRA, M.; SLUPIANEK, A. *et al.* BCR/ABL and other kinases from chronic myeloproliferative disorders stimulate single-strand annealing, an unfaithful DNA double-strand break repair. **Cancer Res**, 68, n. 17, p. 6884-6888, Sep 2008.
- CZOCHOR, J. R.; SULKOWSKI, P.; GLAZER, P. M. miR-155 Overexpression Promotes Genomic Instability by Reducing High-fidelity Polymerase Delta Expression and Activating Error-Prone DSB Repair. **Mol Cancer Res**, 14, n. 4, p. 363-373, Apr 2016.
- DASGUPTA, Y.; KOPTYRA, M.; HOSER, G.; KANTEKURE, K. *et al.* Normal ABL1 is a tumor suppressor and therapeutic target in human and mouse leukemias expressing oncogenic ABL1 kinases. **Blood**, 127, n. 17, p. 2131-2143, 04 2016.
- DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev**, 13, n. 22, p. 2905-2927, Nov 1999.
- DEININGER, M. W.; DRUKER, B. J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. **Pharmacol Rev**, 55, n. 3, p. 401-423, Sep 2003.
- DI LEVA, G.; GAROFALO, M.; CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer. **Annu Rev Pathol**, 9, p. 287-314, 2014.
- DICK, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. **Blood**, 112, n. 13, p. 4793-4807, Dec 2008.
- DIFILIPPANTONIO, M. J.; ZHU, J.; CHEN, H. T.; MEFFRE, E. *et al.* DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. **Nature**, 404, n. 6777, p. 510-514, Mar 2000.

DRUKER, B. J.; GUILHOT, F.; O'BRIEN, S. G.; GATHMANN, I. *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, 355, n. 23, p. 2408-2417, Dec 2006.

ESTIAR, M. A.; MEHDIPOUR, P. ATM in breast and brain tumors: a comprehensive review. **Cancer Biol Med**, 15, n. 3, p. 210-227, Aug 2018.

FANG, Z. H.; WANG, S. L.; ZHAO, J. T.; LIN, Z. J. *et al.* miR-150 exerts antileukemia activity in vitro and in vivo through regulating genes in multiple pathways. **Cell Death Dis**, 7, n. 9, p. e2371, 09 2016.

FEINSTEIN, E.; CIMINO, G.; GALE, R. P.; ALIMENA, G. *et al.* p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88, n. 14, p. 6293-6297, Jul 1991.

FLAMANT, S.; RITCHIE, W.; GUILHOT, J.; HOLST, J. *et al.* Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, 95, n. 8, p. 1325-1333, Aug 2010.

FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. **Ulster Med J**, 76, n. 1, p. 8-17, Jan 2007.

GEORGANTAS, R. W.; HILDRETH, R.; MORISOT, S.; ALDER, J. *et al.* CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 8, p. 2750-2755, Feb 2007.

GIRERD, S.; TOSCA, L.; HERAULT, O.; VIGNON, C. *et al.* Superoxide dismutase 2 (SOD2) contributes to genetic stability of native and T315I-mutated BCR-ABL expressing leukemic cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 498, n. 4, p. 715-722, 04 2018.

HASTINGS, P. J.; LUPSKI, J. R.; ROSENBERG, S. M.; IRA, G. Mechanisms of change in gene copy number. **Nat Rev Genet**, 10, n. 8, p. 551-564, Aug 2009.

HERMEKING, H. MiR-34a and p53. **Cell Cycle**, 8, n. 9, p. 1308, May 2009.

HEYER, W. D.; EHMSSEN, K. T.; LIU, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. **Annu Rev Genet**, 44, p. 113-139, 2010.

HIGGS, G.; SLACK, F. The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis. **J Clin Bioinforma**, 3, n. 1, p. 17, Sep 2013.

HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M.; SILVER, R. T.; SCHIFFER, C. *et al.* European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, 34, n. 4, p. 966-984, 04 2020.

HOCHHAUS, A.; LARSON, R. A.; GUILHOT, F.; RADICH, J. P. *et al.* Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. **N Engl J Med**, 376, n. 10, p. 917-927, 03 2017.

HONDA, H.; USHIJIMA, T.; WAKAZONO, K.; ODA, H. *et al.* Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210(bcr/abl)-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. **Blood**, 95, n. 4, p. 1144-1150, Feb 2000.

HUGHES, T.; BRANFORD, S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. **Blood Rev**, 20, n. 1, p. 29-41, Jan 2006.

- JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. **Am J Hematol**, 95, n. 6, p. 691-709, 06 2020.
- JACKSON, A. L.; LOEB, L. A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. **Mutat Res**, 477, n. 1-2, p. 7-21, Jun 2001.
- JANSSON, M. D.; LUND, A. H. MicroRNA and cancer. **Mol Oncol**, 6, n. 6, p. 590-610, Dec 2012.
- JIANG, X.; CHENG, Y.; HU, C.; ZHANG, A. *et al.* MicroRNA-221 sensitizes chronic myeloid leukemia cells to imatinib by targeting STAT5. **Leuk Lymphoma**, 60, n. 7, p. 1709-1720, 07 2019.
- JOHANSSON, B.; FIORETOS, T.; MITELMAN, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. **Acta Haematol**, 107, n. 2, p. 76-94, 2002.
- JUNTILA, M. R.; EVAN, G. I. p53--a Jack of all trades but master of none. **Nat Rev Cancer**, 9, n. 11, p. 821-829, Nov 2009.
- KARANAM, K.; KAFRI, R.; LOEWER, A.; LAHAV, G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. **Mol Cell**, 47, n. 2, p. 320-329, Jul 2012.
- KEESHAN, K.; COTTER, T. G.; MCKENNA, S. L. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. **Leukemia**, 16, n. 9, p. 1725-1734, Sep 2002.
- KOLOMIETZ, E.; AL-MAGHRABI, J.; BRENNAN, S.; KARASKOVA, J. *et al.* Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. **Blood**, 97, n. 11, p. 3581-3588, Jun 2001.
- KONG, W.; CHENG, Y.; LIANG, H.; CHEN, Q. *et al.* Prognostic value of miR-17-5p in cancers: a meta-analysis. **Onco Targets Ther**, 11, p. 3541-3549, 2018.
- LAHAYE, T.; RIEHM, B.; BERGER, U.; PASCHKA, P. *et al.* Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. **Cancer**, 103, n. 8, p. 1659-1669, Apr 2005.
- LAL, A.; PAN, Y.; NAVARRO, F.; DYKXHOORN, D. M. *et al.* miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. **Nat Struct Mol Biol**, 16, n. 5, p. 492-498, May 2009.
- LANDAU, D. A.; SLACK, F. J. MicroRNAs in mutagenesis, genomic instability, and DNA repair. **Semin Oncol**, 38, n. 6, p. 743-751, Dec 2011.
- LANGDON, W. Y.; HARTLEY, J. W.; KLINKEN, S. P.; RUSCETTI, S. K. *et al.* v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86, n. 4, p. 1168-1172, Feb 1989.
- LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 294, n. 5543, p. 862-864, Oct 2001.

- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, 75, n. 5, p. 843-854, Dec 1993.
- LI, Y.; ZHAO, L.; LI, N.; MIAO, Y. *et al.* miR-9 regulates the multidrug resistance of chronic myelogenous leukemia by targeting ABCB1. **Oncol Rep**, 37, n. 4, p. 2193-2200, Apr 2017.
- LIEBERMAN, H. B.; BERNSTOCK, J. D.; BROUSTAS, C. G.; HOPKINS, K. M. *et al.* The role of RAD9 in tumorigenesis. **J Mol Cell Biol**, 3, n. 1, p. 39-43, Feb 2011.
- LIU, Y.; LU, X. Non-coding RNAs in DNA damage response. **Am J Cancer Res**, 2, n. 6, p. 658-675, 2012.
- LU, G.; DUAN, J.; SHU, S.; WANG, X. *et al.* Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 113, n. 5, p. 1256-1260, Feb 2016.
- MACHOVÁ POLÁKOVÁ, K.; LOPOTOVÁ, T.; KLAMOVIČ, H.; BURDA, P. *et al.* Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. **Mol Cancer**, 10, p. 41, Apr 2011.
- MAYNARD, S.; FANG, E. F.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M.; CROTEAU, D. L. *et al.* DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 5, n. 10, Sep 2015.
- MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nat Rev Cancer**, 7, n. 6, p. 441-453, Jun 2007.
- MENENDEZ, D.; INGA, A.; RESNICK, M. A. The expanding universe of p53 targets. **Nat Rev Cancer**, 9, n. 10, p. 724-737, Oct 2009.
- MOTYCKA, T. A.; BESSHO, T.; POST, S. M.; SUNG, P. *et al.* Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. **J Biol Chem**, 279, n. 14, p. 13634-13639, Apr 2004.
- MURPHY, M.; AHN, J.; WALKER, K. K.; HOFFMAN, W. H. *et al.* Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. **Genes Dev**, 13, n. 19, p. 2490-2501, Oct 1999.
- NAVARRO, F.; LIEBERMAN, J. miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. **PLoS One**, 10, n. 7, p. e0132767, 2015.
- NOWICKI, M. O.; FALINSKI, R.; KOPTYRA, M.; SLUPIANEK, A. *et al.* BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. **Blood**, 104, n. 12, p. 3746-3753, Dec 2004.
- NOWICKI, M. O.; PAWLOWSKI, P.; FISCHER, T.; HESS, G. *et al.* Chronic myelogenous leukemia molecular signature. **Oncogene**, 22, n. 25, p. 3952-3963, Jun 2003.
- O'CONNELL, R. M.; CHAUDHURI, A. A.; RAO, D. S.; BALTIMORE, D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 17, p. 7113-7118, Apr 2009.
- PEIRIS, M. N.; LI, F.; DONOGHUE, D. J. BCR: a promiscuous fusion partner in hematopoietic disorders. **Oncotarget**, 10, n. 28, p. 2738-2754, Apr 2019.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, 29, n. 9, p. e45, May 2001.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett**, 26, n. 6, p. 509-515, Mar 2004.

PICHIORRI, F.; SUH, S. S.; ROCCI, A.; DE LUCA, L. *et al.* Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 Impairs the p53/MDM2 Autoregulatory Loop in Multiple Myeloma Development. **Cancer Cell**, 30, n. 2, p. 349-351, 08 2016.

PINDER, J. B.; ATTWOOD, K. M.; DELLAIRE, G. Reading, writing, and repair: the role of ubiquitin and the ubiquitin-like proteins in DNA damage signaling and repair. **Front Genet**, 4, p. 45, 2013.

POPP, H. D.; KOHL, V.; NAUMANN, N.; FLACH, J. *et al.* DNA Damage and DNA Damage Response in Chronic Myeloid Leukemia. **Int J Mol Sci**, 21, n. 4, Feb 2020.

RADICH, J. P.; DAI, H.; MAO, M.; OEHLER, V. *et al.* Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 8, p. 2794-2799, Feb 2006.

RANDOLPH, T. R. Chronic myelocytic leukemia--Part I: History, clinical presentation, and molecular biology. **Clin Lab Sci**, 18, n. 1, p. 38-48, 2005.

RAVANDI, F.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z. Modulation of cellular signaling pathways: prospects for targeted therapy in hematological malignancies. **Clin Cancer Res**, 9, n. 2, p. 535-550, Feb 2003.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 403, n. 6772, p. 901-906, Feb 2000.

REYES, G. X.; SCHMIDT, T. T.; KOLODNER, R. D.; HOMBBAUER, H. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. **Chromosoma**, 124, n. 4, p. 443-462, Dec 2015.

ROKAH, O. H.; GRANOT, G.; OVCHARENKO, A.; MODAI, S. *et al.* Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. **PLoS One**, 7, n. 4, p. e35501, 2012.

ROWLEY, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, 243, n. 5405, p. 290-293, Jun 1973.

SALESSE, S.; VERFAILLIE, C. M. Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML. **Oncogene**, 21, n. 56, p. 8605-8611, Dec 2002.

SALGIA, R.; UEMURA, N.; OKUDA, K.; LI, J. L. *et al.* CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. **J Biol Chem**, 270, n. 49, p. 29145-29150, Dec 1995.

SAN JOSÉ-ENÉRIZ, E.; ROMÁN-GÓMEZ, J.; JIMÉNEZ-VELASCO, A.; GARATE, L. *et al.* MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. **Mol Cancer**, 8, p. 69, Sep 2009.

SAUÑELE, S.; SILVER, R. T. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. **Ann Hematol**, 94 Suppl 2, p. S159-165, Apr 2015.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, 340, n. 17, p. 1330-1340, Apr 1999.

SCORE, J.; CALASANZ, M. J.; OTTMAN, O.; PANE, F. *et al.* Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. **Leukemia**, 24, n. 10, p. 1742-1750, Oct 2010.

SHAH, N. P. Advanced CML: therapeutic options for patients in accelerated and blast phases. **J Natl Compr Canc Netw**, 6 Suppl 2, p. S31-S36, Mar 2008.

SHAH, N. P.; NICOLL, J. M.; NAGAR, B.; GORRE, M. E. *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. **Cancer Cell**, 2, n. 2, p. 117-125, Aug 2002.

SHAHBAZIAN, D.; PARSYAN, A.; PETROULAKIS, E.; HERSHEY, J. *et al.* eIF4B controls survival and proliferation and is regulated by proto-oncogenic signaling pathways. **Cell Cycle**, 9, n. 20, p. 4106-4109, Oct 2010.

SIMANDI, Z. The Role of DNA Polymerase β in Neural Genome Stability. **J Neurosci**, 37, n. 46, p. 11069-11071, 11 2017.

SIMSEK, D.; JASIN, M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. **Nat Struct Mol Biol**, 17, n. 4, p. 410-416, Apr 2010.

SKORSKI, T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. **Oncogene**, 21, n. 56, p. 8591-8604, Dec 2002a.

SKORSKI, T. Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. **Nat Rev Cancer**, 2, n. 5, p. 351-360, May 2002b.

SKORSKI, T. Genomic instability: The cause and effect of BCR/ABL tyrosine kinase. **Curr Hematol Malig Rep**, 2, n. 2, p. 69-74, May 2007.

SKORSKI, T.; KANAKARAJ, P.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; RATAJCZAK, M. Z. *et al.* Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. **Blood**, 86, n. 2, p. 726-736, Jul 1995.

SLUPIANEK, A.; FALINSKI, R.; ZNOJEK, P.; STOKLOSA, T. *et al.* BCR-ABL1 kinase inhibits uracil DNA glycosylase UNG2 to enhance oxidative DNA damage and stimulate genomic instability. **Leukemia**, 27, n. 3, p. 629-634, Mar 2013.

SMIRNOV, D. A.; CHEUNG, V. G. ATM gene mutations result in both recessive and dominant expression phenotypes of genes and microRNAs. **Am J Hum Genet**, 83, n. 2, p. 243-253, Aug 2008.

SONG, L.; LIN, C.; WU, Z.; GONG, H. *et al.* miR-18a impairs DNA damage response through downregulation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase. **PLoS One**, 6, n. 9, p. e25454, 2011.

SONG, Q.; AN, Q.; NIU, B.; LU, X. *et al.* Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism. **J Oncol**, 2019, p. 7252013, 2019.

SOVERINI, S.; BRANFORD, S.; NICOLINI, F. E.; TALPAZ, M. *et al.* Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. **Leuk Res**, 38, n. 1, p. 10-20, Jan 2014.

SRUTOVA, K.; CURIK, N.; BURDA, P.; SAVVULIDI, F. *et al.* BCR-ABL1 mediated miR-150 downregulation through MYC contributed to myeloid differentiation block and drug resistance in chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, 103, n. 12, p. 2016-2025, 12 2018.

STOKLOSA, T.; POPLAWSKI, T.; KOPTYRA, M.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M. *et al.* BCR/ABL inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations. **Cancer Res**, 68, n. 8, p. 2576-2580, Apr 2008.

TAKAGI, M.; SATO, M.; PIAO, J.; MIYAMOTO, S. *et al.* ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in chronic myelogenous leukemia. **DNA Repair (Amst)**, 12, n. 7, p. 500-507, Jul 2013.

TILI, E.; MICHAILLE, J. J.; WERNICKE, D.; ALDER, H. *et al.* Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 12, p. 4908-4913, Mar 2011.

UEMURA, N.; GRIFFIN, J. D. The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. **J Biol Chem**, 274, n. 53, p. 37525-37532, Dec 1999.

VALERI, N.; GASPARINI, P.; FABBRI, M.; BRACONI, C. *et al.* Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 15, p. 6982-6987, Apr 2010.

VENTURINI, L.; BATTMER, K.; CASTOLDI, M.; SCHULTHEIS, B. *et al.* Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. **Blood**, 109, n. 10, p. 4399-4405, May 2007.

WALLACE, S. S. Base excision repair: a critical player in many games. **DNA Repair (Amst)**, 19, p. 14-26, Jul 2014.

WERTHEIM, J. A.; FORSYTHE, K.; DRUKER, B. J.; HAMMER, D. *et al.* BCR-ABL-induced adhesion defects are tyrosine kinase-independent. **Blood**, 99, n. 11, p. 4122-4130, Jun 2002.

XU, G.; ZHANG, L.; MA, A.; QIAN, Y. *et al.* SIP1 is a downstream effector of GADD45G in senescence induction and growth inhibition of liver tumor cells. **Oncotarget**, 6, n. 32, p. 33636-33647, Oct 2015.

ZHANG, J.; ADRIÁN, F. J.; JAHNKE, W.; COWAN-JACOB, S. W. *et al.* Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. **Nature**, 463, n. 7280, p. 501-506, Jan 2010.

ZHOU, D.; SHAO, L.; SPITZ, D. R. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. **Adv Cancer Res**, 122, p. 1-67, 2014.

ZOUEIN, F. A.; DUHÉ, R. J.; ARANY, I.; SHIREY, K. *et al.* Loss of STAT3 in mouse embryonic fibroblasts reveals its Janus-like actions on mitochondrial function and cell viability. **Cytokine**, 66, n. 1, p. 7-16, Mar 2014.