

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PABLO FERREIRA DAS CHAGAS

**ANÁLISE DAS REGIÕES UC.112, UC.122, UC.160 E UC.252 NA LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA**

Alfenas/MG

2017

PABLO FERREIRA DAS CHAGAS

**ANÁLISE AS REGIÕES UC.112, UC.122, UC.160 E UC.252 NA LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Chagas, Pablo Ferreira das

Análise das Regiões uc.112, uc.122, uc.160 e uc.252 na Leucemia
Linfoide Aguda / Pablo Ferreira das Chagas. -- Alfenas/MG, 2017.
82 f.

Orientadora: Jaqueline Carvalho de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras. I. Oliveira,
Jaqueline Carvalho de. II. Título.

CDD-571.6

Dedico este trabalho às crianças e adolescentes diagnosticadas com Leucemia Linfoide Aguda que corroboraram para realização do mesmo, e aos seus familiares.

AGRADECIMENTOS

Em especial à minha orientadora Prof^a. Dra. **Jaqueline Carvalho de Oliveira**, por todo carinho, compreensão, paciência e credibilidade depositado tanto ao seu orientando como para com o projeto e realização do mesmo. Obrigado por todas orientações que foram essenciais aos processos inerentes em busca do conhecimento científico. Obrigado por ter sido tão única nesse rito de passagem, e por ter me ensinado que no final: “Tudo vai dar certo”!

Agradeço ao meu Coorientador Prof. Dr. **Nelson José Freitas da Silveira**, por ter me acolhido logo ao final desta etapa, cedendo toda atenção e confiança ao projeto e por ter acreditado que juntos poderíamos fazer a diferença e concretizar um sonho. Professor, muito obrigado!

Ao Prof. Dr. **Luiz Gonzaga Tone**, Prof. Dr. **Carlos Alberto Scrideli**, e à Dra. **Rosane Gomes de Paula Queiroz**, do HCFMRP-USP, pelo carinho, confiança, credibilidade depositado na realização do projeto.

Ao **Instituto Boldrini**, por ter apoiado a idealização deste projeto e colaboração com o mesmo.

À Matriarca de minha família: **Maria José Ferreira** (*in memoriam*), aos meus Pais: **Rita Maria Ferreira** e **José Francisco das Chagas**; aos meus irmãos **Diego Ferreira da Silva** e **Taís Roberta da Silva Chagas**. Obrigado por serem os alicerces fundamentais em minha vida, e por não me deixarem desistir!

Às minhas orientadoras e orientador de Iniciação Científica durante minha graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Sapucaí: Prof^{as}. Dra. **Adriana; Marilda; Sandra; Carol; Sávia; Fabíola** e Prof. Dr. **Manoel**.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, discussões e sugestões que servirão para meu crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Ao coordenador do programa de Pós-graduação Prof. Dr. **Luiz Felipe Leomil Coelho**, e ao vice coordenador Prof. Dr. **Marcos José Marques**, e ao Prof. Dr. **Luiz Cosme Cotta Malaquias**, por terem me ouvido, amparado e despertado novamente a força de continuar no Mestrado após algumas dificuldades pertinentes quando no momento a maturidade do “se tornar adulto”

se fez por necessário.

À **Graziela, Márcio, Leilane, Rafael, Évila, Carol e Yara** que foram essenciais no início do desenvolvimento deste projeto, por terem me ensinado tudo que precisava, por terem tido paciência e compreensão com todas as dificuldades que tinha. Vocês se tornaram irmãos científicos, consolidamos juntos uma equipe que infelizmente devido às circunstâncias atuais nos separamos, mas acreditem: de nada adiantaria tanto esforço se não pudesse carregar cada um de vocês em um lugar especial em meu coração. Com vocês aprendi muito sobre humildade e companheirismo, tive uma nova visão do mundo acadêmico longe das cobranças e pressão do dia a dia! Com vocês eu consegui descobrir e resgatar a felicidade de se manter vivo perante os obstáculos que juntos enfrentamos e superamos! Esta conquista é literalmente parte do que consegui somar convivendo ao lado de cada um de vocês, e não há palavras suficientes que possam expressar imensa gratidão, eu amo muito vocês.

À Prof^a. Dra. **Marília Caixeta Franco Ariosa**, por ter sido um exemplo de conduta profissional.

À Prof^a Dra. **Marisa Ionta**, que logo no início, antes mesmo de ter sido aprovado no processo seletivo, me acolheu nas dependências de seu laboratório depositando toda confiança e credibilidade.

Ao Prof. Dr. **Valdemar Antônio Paffaro Júnior**, por ter sido Pai, amigo e confidente! Professor, jamais esquecerei do carinho e sorriso ofertado após ter sido aprovado no processo seletivo, e obrigado também por ter cedido todo espaço físico de seu laboratório para continuidade deste projeto.

Aos membros do **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Federal de Alfenas, por terem compartilhado tanto conhecimento durante minha formação.

À Dra. **Maria Sol Brasseco Annichini** HCFMRP-USP, por ter se tornado uma amiga, por me motivar e acreditar que poderia sempre ser capaz de demonstrar o meu melhor.

Ao Prof. Dr. **Angel Maurício Castro Gamero**, pela receptividade em suas aulas, e compartilhamento de conhecimentos únicos inerentes às grandes áreas da genética.

Às secretárias do programa de Pós-graduação **Denise** e **Martha**, por tanta paciência e disposição que demonstraram desde o início, e pelo ombro amigo que sempre ofereciam nos momentos de dificuldades.

À todos os integrantes do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (**Labaint**) UNIFAL-MG, sendo estes: Técnicos, Professores, alunos de Graduação, Iniciação Científica, Mestrandos e Doutorandos. Em especial: **Neusa, Isabel, Glícia, Rodrigo, Guilherme, Renato, Simone, André, Délcio** e **Josi**, por todos os momentos felizes e desesperadores que passamos juntos! Vocês se tornaram parte de minha família.

À todos os integrantes do Laboratório de Modelagem Molecular e Simulação Computacional (**MolMod-Cs**), pela acolhida e companheirismo ao final do desenvolvimento deste projeto.

Aos **alunos**, e **amigos** do Laboratório de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Às agências financiadoras, **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da minha bolsa de Mestrado, **FAPESP** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), **FAPEMIG** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo auxílio financeiro do projeto.

Às grandes amigas da Pós-graduação que passaram por minha vida e fizeram a diferença aqui em Alfenas: **Aline, Andressa, Bárbara, Gabriela, Hamanda, Michele, Manuella e Raíssa**.

Às Farmacêuticas Bioquímicas do Méthodos Laboratório, que muito me ensinaram e acolheram juntamente na área da saúde. Foi com vocês que aprendi a dar os primeiros passos científicos como profissional: Dr.^{as} **Clara, Cléa, Elaine, Márcia, Sávia** e **Silmara**. Em especial, à Dra. **Luzia** e Dr. **Anísio**. Obrigado.

E à **Ayahuasca** medicina.

“Quando eu aprendi a ler e a escrever, eu devorava os livros! [...] Eu pensava que livro é como árvore¹e, é como bicho: coisa que nasce! Não descobria que era um autor! Lá pelas tantas, eu descobri que era um autor! Aí disse: “Eu também quero””

1

RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma neoplasia de células hematopoiéticas caracterizada pela proliferação e acúmulo de blastos comprometidos com a linhagem linfóide na medula óssea (MO). Apesar de todo avanço no tratamento, ainda 20 a 30% dos pacientes sofrem recaída e as causas dessa falha permanecem desconhecida. Recentemente, a análise de expressão de RNAs não codificadores (ncRNA) de proteínas tem se mostrado uma abordagem promissora e informativa, entre esses, ncRNA identificados em regiões ultraconservadas transcritas (T-UCRs). Em 2007, um trabalho precursor sobre o tema, identificou o perfil de expressão dos T-UCRs característico à Leucemia Linfóide Crônica (LLC) e aos carcinomas hepatocelular e colorretal. Posteriormente, a desregulação de alguns T-UCRs também foi descrita em neuroblastoma pediátrico, e em outros tumores, porém, na LLA não foi encontrado nenhum trabalho que analisa o perfil de expressão de qualquer T-UCR em amostras de MO tumoral. Visto a grande heterogeneidade molecular nessa doença e a necessidade do melhor entendimento das vias moleculares que possam estar envolvidas com a progressão da doença, o objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão de alguns T-UCRs em 58 amostras de MO de crianças e adolescentes diagnosticados com LLA e buscar associações do nível de expressão a características biológicas e clínicas. Para isso, foi utilizado amostras de medula óssea de pacientes com LLA coletadas ao diagnóstico e realizado a análise de expressão gênica através da técnica de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real quantitativo (qRT-PCR) $P < 0,05$, das regiões ultraconservadas uc.112; uc.122; uc.160; uc.252; uc.262 e uc.316. Os resultados apontaram uma hiperexpressão da região uc.112 em amostras de MO com LLA em relação as amostras de MO sem doenças hematológicas, como também em pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda de células T (LLA-T) com relação aos pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda de células B (LLA-B), apresentou também uma baixa expressão e pacientes com hiperdiploidia e está associada à alguns fatores de transcrição. A região uc.160 também obteve uma expressão aumentada em pacientes LLA-T com relação aos pacientes LLA-B e ainda sofre influências de alguns fatores de transcrição sendo estes: EZH2, SUZ12, MAX, CTFC, CHD2, ELF1, RUNX3, XY1, E2F6, RAD21, EBF1,

SMC3, USF1. A região uc.262 encontrou-se hipoexpressa em amostras de MO com LLA em relação as amostras livre de doenças hematológicas. O presente trabalho contribui para sugestão de um possível envolvimento dos T-UCRs na LLA, porém, novas análises se fazem necessárias para confirmar e estender esses achados.

Palavras Chave: Leucemia Linfóide Aguda.RNA não codificador de proteína.
.uc.112. uc.160.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematopoietic cell neoplasm characterized by proliferation and accumulation of blasts compromised with lymphoid lineage in the bone marrow. Despite all the progress not treatment, still 20 to 30% of patients suffer relapse and as causes of this failure remain unknown. Recently, an expression analysis of non-coding RNAs (ncRNA) proteins has a promising and informative approach, among these, ncRNAs identified in ultraconserved transcripts (T-UCRs). In 2007, a pioneering work on the subject identified the expression profile of T-UCR characteristic of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and hepatocellular and colorectal carcinomas. Subsequently, the deregulation of some T-UCRs has also been described in pediatric neuroblastoma, and in other tumors, however. The present work was to analyze the expression of some T-UCRs in 58 samples of bone marrow of children and adolescents diagnosed with ALL. In order to understand the molecular pathways involved in disease progression, And seek association of level of expression with biological and clinical characteristics. (PCR) in quantitative real time (qRT-PCR) $P < 0.05$, from the regions Ultraconserved uc.112; uc.122; uc.160; uc.252; uc.262 and uc.316. The results indicated hyperexpression of the uc.112 region in bone marrow samples with ALL as samples of bone marrow without hematological diseases, as well as in patients diagnosed with acute T-cell Lymphoid Leukemia (T-ALL) in relation to patients diagnosed with Leukemia Acute lymphoid B-cell (B-ALL) has also been shown to be low expression and hyperdiodal patients and is associated with some transcription factors. EZH2, SUZ12, MAX, CTFC, CHD2, ELF1, RUNX3, XY1, E2F6, RAD21, EBF1, SMC3, USF1. The uc.262 region was found hypoexpressed in samples of bone marrow with ALL as samples free of haematological diseases. The present work contributes to the suggestion of a possible involvement of T-UCRs in ALL, however, new analyzes are necessary to confirm and extend these findings.

Keywords: Acute Lymphoid Leukemia. non-coding RNA. ultra-conserved transcyte regions. uc.112. uc.160.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Análise da expressão das regiões uc.112, uc.122 (B), uc.160 (C) e uc.262 (D). MO não tu = amostra de medula óssea não tumoral e LLA = amostras de medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda. A linha vertical indica a mediana.
Teste estatístico: Mann-Whitney..... 51
- Figura 2 – Análise da expressão das regiões uc.112(A), uc.122(B), uc.160(C) e uc.262(D). LLA-T= amostras de medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda de células T, e LLA-B= amostras de medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda de células B. A linha vertical indica a mediana.
Teste estatístico: Mann-Whitney..... 54
- Figura 3 – Análise da expressão das regiões uc.112(A), uc.122(B), uc.160(C) e uc.262(D). Positivo=pacientes com presença de hiperdiploidia e negativo=pacientes com ausência de hiperdiploidia. A linha vertical indica a mediana.
Teste estatístico: Mann-Whitney..... 55
- Figura 4 – Análise de sobrevida dos pacientes com LLA associado a análise de expressão gênica dos transcritos da região uc.112..... 56
- Figura 5 – Análise de sobrevida dos pacientes com LLA associado a análise de expressão gênica dos transcritos da região uc.122 57
- Figura 6 – Análise de sobrevida dos pacientes com LLA associado a análise de expressão gênica dos transcritos da região uc.160 58

Figura 7 – Análise de sobrevivência dos pacientes com LLA associado a análise de expressão gênica dos transcritos da região uc.262	59
Figura 8 – Análise de bioinformática da região uc.112 após alinhamento com BLAST	60
Figura 9 – Análise de bioinformática da região uc.112 após alinhamento com BLAST	61
Figura 10 – Análise de bioinformática UCSC utilizando a região uc.112	63
Figura 11 – Análise de bioinformática UCSC utilizando a região uc.160	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos primers usados nas reações de quantificação por PCR.....	43
Tabela 2 - Sequência de nucleotídeos das regiões uc.112 e uc.160 utilizados para análises de Bioinformática.....	47
Tabela 3 - Associação entre o nível de expressão dos T-UCRs uc.112; uc.160; uc.122 e uc.262 e parâmetros clínicos e biológicos em pacientes com LLA (Teste Mann Whitney).....	53

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

TLX3	-T-Cell Leukemia Homeobox 3
CALLA	-common acute lymphocytic leukemia antigen
cDNA	-DNA complementar
Ch	-Cromossomos
DEPC	-Di-etil pirocarbonato
DNA	-Ácido desoxirribonucleico
DRM	-Doença Residual Mínima
EGIL	- <i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>
GB	-Glóbulos brancos
GBTLI	-Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil
HCFMRP-USP	-Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo
Ig	-Imunoglobulina
lincRNAs	-RNAs longos não codificantes intergênicos
LLA	-Leucemia Linfóide Aguda
LLA-B	-Leucemia Linfóide Aguda de células B
LLA-T	-Leucemia Linfóide Aguda de células T
LLC	-Leucemia Linfóide Crônica
LMA	-Leucemia Mielóide Aguda
LMC	-Leucemia Mielóide Crônica
lncRNAs	-RNAs longos não codificantes
mESCs	-mouse embryo stem cells
miR	-Micro RNA
miRNAs	-micro-RNAs
MLL	-mixed lineage leukemia
mm³	-Milímetros cúbicos
MO	-Medula óssea
mRNA	-RNA mensageiro
ncRNAs	-RNAs não-codificadores de proteínas

Ng	-Nanogramas
Oct4	- <i>octamer-binding transcription fator 4</i>
Pb	-Pares de bases
PBS	- <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i>
SNC	-Sistema Nervoso Central
SNP	-Polimorfismo de um único nucleotídeo
TdT	-Terminal deoxinucleotidil transferase
TLX1	- <i>T-Cell Leukemia Homeobox 1</i>
TLX3	-T-Cell Leukemia Homeobox 3
T-UCRs	-Regiões Ultraconservadas Transcritas
UCRs	-Regiões Ultraconservadas
UCSC	-Universidade da Califórnia Santa Cruz
$\Delta\Delta Ct$	-Delta delta cycle threshold method

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.2	Leucemia Linfoide Aguda	24
2.3	IMUNOFENÓTIPO	25
2.3.1	Leucemia Linfoide Aguda de células B (LLA-B)	25
2.3.2	Leucemia Linfoide Aguda de células T (LLA-T)	25
2.4	ALTERAÇÕES GENÉTICAS NA LLA-B E LLA-T	26
2.5	Hiperploídia/Hipodiploídia	27
2.7	Alterações genética na LLA-T	29
2.8	Tratamento da LLA	30
2.9	RNAs não-codificadores de proteínas.....	31
2.10	Regulação transcricional de ncRNAs	33
2.11	Regiões Ultraconservadas.....	34
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Pacientes com LLA.....	40
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA	41
4.3	ANÁLISE DE INTEGRIDADE	41
4.4	Tratamento com DNase e síntese de cDNA	42
4.5	Quantificação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	42
4.6	Análises Estatísticas.....	45
4.7	Análises de Bioinformática	47
5	RESULTADOS	50
5.1	Análise de Eficiência dos primers.....	50
5.2	EXPERIMENTO PILOTO	50
5.3	Análise das amostras LLA em relação às medulas não tumorais.....	51
5.4	ASSOCIAÇÃO DAS T-UCRS COM PARÂMETROS CLÍNICOS	53
5.5	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE EVENTOS.....	56
5.6	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	60
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

As leucemias são neoplasias de células hematopoiéticas que se originam a partir de células transformadas na medula óssea (MO) (IRONS; STILMANN, 1996). Podem ser classificadas em agudas ou crônicas dependendo do grau de maturação das células neoplásicas (PUI, 1999). A leucemia linfóide aguda (LLA) é caracterizada pela rápida proliferação e o acúmulo de blastos imaturos da linhagem linfóide na MO (PUI, 2010). E classificam-se ainda de acordo com a linhagem precursora do linfócito em questão sendo estes do tipo B (LLA-B) ou do tipo T (LLA-T) (PUI; RELLING; DOWNING, 2004).

A LLA é apontada como o câncer mais diagnosticado durante a infância, tendo incidência maior em crianças entre 2 e 5 anos (PEDROSA; LINS, 2002; PUI; EVANS, 2006). Representa 80% dos casos de leucemias e 30% dos cânceres na infância (NIGRO, 2013; LE JEUNE, 2014).

Alguns critérios básicos para a estratificação de grupos de risco dos pacientes com LLA incluem idade, contagem leucocitária, imunofenótipo (LLA-B ou LLA-T), envolvimento no sistema nervoso central (SNC), resposta inicial ao tratamento e a presença de alterações gênicas (PUI, 2010; SZCZEPANEK et al., 2011). Esta estratificação proporciona a utilização de protocolos específicos para tratamento, possibilitando definir qual intensidade da terapia a ser administrada (SMITH et al., 1996).

Existem também outros marcadores de prognóstico, como a presença de doença residual mínima (DRM), que utiliza técnicas que detectam quantidades de leucemia residual que não é detectável através de exame morfológico, assim como o índice de DNA da célula leucêmica (DOWNING, 2004; FRIEDMANN, 2000; PUI; EVANS, 1998; SCRIDELI et al., 2009).

A imunofenotipagem é feita através da citometria de fluxo, o que determina a linhagem de uma leucemia aguda recém-diagnosticada analisando a expressão de alguns antígenos celulares específicos proporcionando a identificação de precursores de linfócitos B (LLA-B) 85% e T (LLA-T) 15%. A LLA-T é associada a um pior prognóstico e apresenta maior recaída durante a fase de indução (fase inicial do tratamento) (BELMONTE et al., 2016;

BHOJWANI; YANG; PUI, 2015). Análises citogenéticas também auxiliam na melhor estratificação dos grupos de risco (GREAVES, 2002; SZCZEPANEK et al., 2011). Protanto, o grande número de subtipos e características biológicas da LLA apontam uma grande heterogeneidade nesta doença complexa/multifatorial (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; KEBRIAEI; LARSON, 2003).

Do ponto de vista clínico/biológico, o Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI) sugere que os pacientes com LLA sejam inicialmente classificadas em alto e baixo risco baseado na idade e contagem leucocitária ao diagnóstico. Os pacientes com idade entre <1 ano e >9 anos ou com contagem leucocitária >50.000/mm³ são inclusos na categoria de alto risco, ficando categorizados como de baixo risco os pacientes com idade entre 1-9 anos e contagem leucocitária <50.000/mm³. (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; KEBRIAEI; LARSON, 2003).

O tratamento da LLA, de uma forma geral, consta de três fases principais: indução, consolidação e manutenção (PUI, 2015). A utilização de fármacos com diferentes mecanismos de ação (poliquimioterapia) é o tratamento mais indicado para a LLA e pode ser adaptado de acordo com o risco de recaída dos pacientes (PUI, 2015). A aplicação de protocolos, como o GTBLI que estratifica pacientes em grupo de risco para indicação da poliquimioterapia, vem corroborando de forma positiva na cura dos pacientes, alcançando cerca de 80 a 90% da remissão total em alguns centros específicos de tratamento (PUI; EVANS, 2006).

Porém, apesar de todos os avanços no tratamento da LLA e os bons resultados obtidos através do uso intensivo e combinado de diferentes quimioterápicos e melhora dos protocolos utilizados, em média, ainda 20 a 30% dos pacientes sofrem recaídas e as causas dessa falha permanecem desconhecidas (CARROLL; RAETZ, 2013; KARATHANANANIS et al., 2009). Adicionalmente, entre os pacientes com recaída precoce (até 36 meses do diagnóstico), 10% possuem chance de cura e remissão total da doença (CARROLL; RAETZ, 2013; SCHAFFER; HUNGER, 2011).

Esses dados sugerem a necessidade de uma melhor estratificação dos pacientes nos grupos de risco e na identificação de novos marcadores

moleculares que são de suma importância para auxiliar na compreensão biológica da doença visando um melhor prognóstico (LE JEUNE; THOMAS, 2016). Recentemente, a análise de expressão de RNAs não-codificadores de proteínas (ncRNAs) tem se mostrado uma abordagem promissora e grandemente informativa, principalmente com a identificação de microRNAs (miRNAs).

A associação de miRNAs com a classificação e prognóstico em muitos tipos tumorais já foi evidenciado, inclusive na LLA infantil (CORTEZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012a; OLIVEIRA et al., 2012b). Sabe-se que os miRNAs possuem mecanismos reguladores envolvidos na leucemogênese, e a grande heterogeneidade da expressão dos mesmos na LLA permite uma diferenciação de tecidos normais e subtipos de amostras tumorais (OLIVEIRA et al., 2012; EMMRICH et al., 2014; LIZ; ESTELLER, 2016; ORGANISTA-NAVA et al., 2015). Apesar das informações encontradas para análises de miRNAs, poucos estudos têm buscado alterações de expressão de outras classes de ncRNAs .

As regiões ultraconservadas (UCRs) são sequências genômicas, maiores a 200 pares de bases (pb), identificadas após comparação do genoma de ratos, camundongos e humanos (BEJERANO et al., 2004). Sabe-se que 93% destas regiões são transcritas, nomeadas de regiões ultraconservadas transcritas (T-UCRs), e algumas delas podendo originar ncRNAs longos (lncRNAs) e lncRNAs intergênicos (lincRNAs) (CALIN et al., 2007; SCARUFFI, 2011).

Calin e colaboradores em 2007, demonstraram que uma grande parcela dos T-UCRs possuem padrões de perfis únicos de expressão no câncer, mais especificamente, a análise do perfil de expressão dessas regiões revelou uma assinatura específica para leucemia linfóide crônica, câncer colorretal e carcinoma hepatocelular (CALIN et al., 2007).

Esse estudo precursor também identificou que muitas UCRs estão frequentemente localizados em sítios frágeis do genoma, conhecidamente importantes na carcinogênese, além da descrição de alguns T-UCRs regulados por miRNAs em leucemia, e envolvidas com a regulação da apoptose (CALIN et al., 2007).

Nota-se que os T-UCRs podem participar de processos celulares importantes, sendo que alguns possuem níveis de expressão alterados em alguns tipos de câncer (REIS; VERJOVSKI, 2012), já evidenciado em neuroblastoma (MESTDAGH et al., 2010); hepatocarcinoma (BRACONI et al., 2011); câncer de próstata (HUDSON et al., 2013), câncer de esôfago (FASSAN et al., 2014) e pancreático (JIANG et al., 2016).

Torna-se algo desafiador desvendar as funções biológicas dos T-UCRs e compreender seu impacto sobre a fisiologia celular, pois as mesmas ainda permanecem desconhecidas (HUDSON et al., 2013; QUAGLIATA; TERRACCIANO, 2014).

Na LLA, não foi encontrado nenhum trabalho que analisa o perfil de expressão de qualquer T-UCR em amostras de MO de pacientes. A partir das informações aqui apresentadas, o presente trabalho propôs avaliar a expressão de alguns T-UCRs em amostras de MO de crianças e adolescentes com LLA e buscou associar a expressão destes transcritos com características biológicas e clínicas dos pacientes, visando a melhoria contínua da estratificação dos grupos de risco e até mesmo sugerir potenciais novos alvos terapêuticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Serão esmiuçadas características comuns presentes na LLA-B e LLA-T sendo a T conhecida como subtipo de pior prognóstico. Assim como a descrição das UCRs, e potenciais ncRNAs derivados dos T-UCRs já evidenciadas com alteração de expressão em alguns tipos tumorais.

2.1 LEUCEMIAS

A hematopoiese normal do indivíduo é controlada através de fatores de crescimento e liberação de citocinas, regulando assim a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (IRONS; STILLMAN, 1996). As leucemias caracterizam-se pela proliferação anormal e desordenada de leucócitos na MO promovendo alterações no normal funcionamento da hematopoiese originando os primeiros sinais e sintomas da doença (PUI, 2010).

Antes mesmo do diagnóstico e caracterização de leucemia, ocorre uma fase pré-leucêmica na qual, geralmente, os pacientes possuem algumas alterações displásicas ou anormalidades citogenéticas clonais em uma ou mais linhagens dos leucócitos antes mesmo de apresentarem mais lesões no DNA que proporciona o potencial maligno celular (IRONS; STILLMAN, 1996). Logo, as células leucêmicas apresentam duas ou mais alterações moleculares originadas e transformadas na MO, e estas células passam por vários processos antes de possuírem o potencial maligno, perdendo o potencial de maturação e diferenciação, originando as características da leucemogênese e transmitindo essa mutação para os seus subclones monoclonais (GREAVES, 2002; IRONS; STILMANN, 1996; MULLIGHAN, 2016; PUI, 2010). Estes clones leucêmicos carregam consigo as mutações adquiridas, e a carga de mutação clonal pode variar de acordo com processos de recaídas ou progressão da doença (MA, et al.; 2015).

As células quando transformadas na MO, podem adquirir capacidade de infiltrarem em diversos órgãos, interferindo na funcionalidade desses, sendo o fígado, linfonodos, baço, timo, gônadas os mais atingidos (LE JEUNE; THOMAS, 2016; PUI; JEHA, 2007). Adicionalmente, as células leucêmicas

podem acometer o SNC migrando através do endotélio e promovendo a infiltração do plexo coroide ou a extensão da MO cranial envolvida (FORESTER, et al., 2009).

As leucemias são classificadas em agudas ou crônicas, de acordo com o grau de maturação das células neoplásicas, em leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia mielóide crônica (LMC) ou LLA e leucemia linfóide crônica (LLC) de acordo com a origem celular (PUI, 1999).

2.2 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

A LLA pode desenvolver-se a partir de qualquer célula de linhagem linfóide alterada em qualquer estágio inicial de maturação e desenvolvimento, promovendo proliferação clonal e acúmulo de linfócitos imaturos na MO (PUI; EVANS, 1998; PUI, JEHA, 2007). É um tipo de câncer heterogêneo, tendo sua origem interferida por fatores imunológicos, genéticos e ambientais que direta ou indiretamente auxiliam para a progressão e desenvolvimento do fenótipo maligno da doença (IRONS; STILMANN, 1996; KULIS et al., 2012). É o câncer mais diagnosticado na infância, representando 80% das leucemias em crianças até 15 anos e um quarto de todos os casos de câncer (PEDROSA; LINS, 2002; PUI; EVANS, 2006).

O diagnóstico definitivo da LLA dá-se através de um exame de MO (aspirado ou biópsia) identificando alterações morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas (ARICÒ et al., 2002). A classificação dos linfócitos através da imunofenotipagem promove avanços clínicos que contribuem para uma melhor ação terapêutica (PUI; EVANS, 1998), na qual, através da análise de perfil de antígenos expressos nas superfícies dos linfócitos, é possível realizar a estratificação de acordo com a linhagem linfocítica em questão, LLA-B ou LLA-T. A idade e a contagem de leucócitos ao diagnóstico são fatores muito importante na classificação e aplicação de protocolos específicos, mas algumas características genéticas também podem influenciar nas respostas ao tratamento (PUI; EVANS, 2006). E além de analisar as diferenças multifatoriais na biologia tumoral, é importante salientar o cuidado preciso com as

necessidades sociais e psicológicas das crianças e adolescentes diagnosticados com LLA (SCHAFER; HUNGER, 2011).

Os sintomas clínicos recorrentes da LLA incluem: dor (ósseas e articulares), febre (causada pela leucemia ou infecção secundária), fadiga (anemia), sangramento de linfadenopatia, hipertensão intracraniana causando cefaleia e vômitos, derrames pleurais associados a veia cava superior e paralisia do nervo craniano (PUI; RELING; DOWNING, 2004).

2.3 IMUNOFENÓTIPO

2.3.1 Leucemia Linfóide Aguda de células B (LLA-B)

Em relação ao imunofenótipo da LLA, são encontradas duas classes principais, B (LLA-B) e T (LLA-T). No subtipo LLA-B, são expressos uma grande variedade de antígenos específicos de acordo com o grau de maturação e diferenciação que os linfócitos se encontram (MULLIGHAN, 2012).

De acordo com o *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL), a LLA-B pode ser subclassificada em quatro tipos: pró-B, expressam HLA-DR; TdT (Terminal deoxinucleotidil transferase); CD34; CD19 e CD22; precursor B Comum: antígeno CD10, conhecido como *common acute lymphocytic leukemia antigen* (CALLA), CD19 e/ou CD20; Em pré-B: IgM (cadeia μ) citoplasmática; CD19; CD20 e CD10 e em B maduro: cadeias leves de imunoglobulina (Ig) (CHAUFFAILLE; YAMAMOTO, 2014; ONCIU, 2009).

A LLA-B é mais comum em crianças e adolescentes, representando 80% dos casos de LLA, na qual pró-B representa 5%, 75% correspondem ao subtipo comum e 15% de pré-B, sendo apenas 2-5% do tipo maduro (FARIAS; CASTRO, 2004; MULLIGHAN, 2012).

2.3.2 Leucemia Linfóide Aguda de células T (LLA-T)

Os estágios de desenvolvimento normal do timócito, também pode ser utilizado para subclassificação da LLA-T, onde é subdividida em 3 subgrupos com a expressão de antígenos específicos também analisados através da citometria de fluxo, sendo estes:

Fase pré-T, expressos CD3; CD7; CD2; CD5 e TdT. Na fase T-intermediário, há uma grande expressão de CD3; CD2 e CD12, sendo apontadas também algumas co-expressões de CD4 e CD8. Em T-comum e maduro, são encontrados expressos CD2; CD3; CD4; CD5; Cd7 e CD8.

Dentre os casos de LLA infantil a LLA-T representa cerca de 15-20%, e esses estão associadas geralmente com maior resistência as fases iniciais de tratamento e maior índice de recaídas quando comparados ao grupo LLA-B por apresentarem um mecanismo de resistência maior aos quimioterápicos e isto ainda não é muito bem explicado, sendo portanto um grupo de pior prognóstico necessitando de uma terapia intensificada (ARICÒ et al., 2002; BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; GOLDBERG et al., 2003).

2.4 ALTERAÇÕES GENÉTICAS NA LLA-B E LLA-T

É necessário um conjunto de alterações genéticas para progressão tumoral, proporcionando aos linfócitos em questão um grande e invasivo potencial maligno (WIEMELS et al., 1999), e a análise de alterações genéticas numéricas e estruturais nos pacientes com LLA contribuem no entendimento da origem leucêmica e auxiliam na indicação do protocolo a ser utilizado na busca de um tratamento mais adequado (GREAVES, 2002).

As anormalidades cromossômicas e moleculares adquiridas e somadas durante a expansão clonal, pode ter início ainda no período fetal, intervindo no processo de diferenciação e maturação celular nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário (NIGRO, 2013), estas alterações genéticas podem ocorrer também no período pós-natal podendo estas serem mutações de ponto, deleções gênicas, translocações ou qualquer outro distúrbio e dano ao DNA (WIEMELS et al., 1999). As translocações cromossômicas são muito comuns em pacientes com LLA e podem ser os primeiros eventos da leucemogênese (GREAVES, 2002; MOORMAN et al., 2014; WIEMELS et al.,

1999). Importante ressaltar que quando um paciente sofre recaída ao tratamento as alterações genéticas tendem a aumentar, pois a célula leucêmica pode acumular novas lesões ao DNA, e estas alterações podem incluir genes que interferem na resistência as combinações quimioterápicas (NIGRO, 2013).

Cerca de 75% das crianças portadoras de LLA apresentam anormalidades cromossômicas, sendo as mais frequentes as alterações numéricas (MA et al., 2015), como por exemplo a hiperdiploidia com a presença de mais de 50 cromossomos por célula, que é associada a um melhor prognóstico. Algumas síndromes como a de Klinefelter, Bloom e Síndrome de Down podem estar associadas com a predisposição à LLA, como por exemplo a Síndrome de Down é encontrada com incidência vinte vezes maior em portadores de LLA (NIGRO, 2013; PUI; RELING; DOWNING, 2004).

São inclusos na LLA-B vários subgrupos citogenéticos com diferentes características biológicas que interferem na sensibilidade as drogas. Na LLA-T, as alterações cromossômicas não estão intimamente ligadas à decisão terapêutica da doença, mas podem ser relacionadas com o desfecho clínicos (PUI; RELING; DOWNING, 2004).

2.5 HIPERPLOIDIA/HIPODIPLOIDIA

A hiperdiploidia é caracterizada pela presença de 51-65 cromossomos, independente dos cromossomos envolvidos. Está presente entre 20 a 30% dos casos de LLA infantil, geralmente encontrada em LLA-B de crianças mais novas, porém não lactentes, e é considerado um fator de bom prognóstico. (ARICO et al., 2000; HUANG et al., 2012; SUTCLIFFE et al., 2005). Já a hipodiploidia (44-45 cromossomos) está presente em 8% dos casos e está associada a um prognóstico desfavorável (MULLIGHAN, 2015; VROOMAN; SILVERMAN, 2009).

2.6 Translocações (t)

Geralmente, reconhecidos como primeiro evento na leucemia (HARRISON et al., 2005), aqui serão apresentados algumas translocações mais frequentes:

A translocação t(12;21), caracterizada pela fusão dos genes *TEL/AML1* ou *ETV6/RUNX1*, é a mais comum sendo encontrada em aproximadamente 20% dos casos de pacientes com LLA, principalmente em pacientes LLA-B até os 10 anos (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015). Por apresentarem ao diagnóstico uma baixa contagem de leucócitos com relação aos outros subtipos, essa translocação está relacionada a um prognóstico favorável (FORESTIER et al., 2009; HARRISON et al., 2005).

A presença do cromossomo Filadélfia (*BCR/ABL1*), resultante da translocação t(9;22) (q34;q11), é considerado um marcador de pior prognóstico (ÀRICO et al., 2000; MOORMAN, 2016), e dá origem a uma proteína quimérica de atividade tirosina quinase elevada (MOORMAN, 2016). Cerca de 3-5% dos casos de LLA infantil apresentam esse tipo de translocação (MULLIGHAN, 2012). Os pacientes com essa translocação apresentam uma sobrevida livre de eventos (recaída) <20% dos casos, onde na maioria das vezes o tratamento indicado é o transplante de medula óssea (FLETCHER et al., 1992; HARRISON; FORONI, 2002).

A translocação t(1;19) (q23; p13) ocorre em 6% dos pacientes com LLA e envolve a fusão *TCF3-PBX1*, o qual se liga a proteína HOX interferindo na diferenciação hematopoiética (MULLIGHAN, 2012). Essa translocação foi inicialmente relacionada a um desfecho clínico de pior prognóstico, porém, novos esquemas de tratamentos intensivos desfizeram esta associação (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015).

Translocações envolvendo o gene *MLL* (*mixed lineage leukemia*) também são frequentes. O gene *MLL* mapeado no 11q23, tem papel fundamental na hematopoiese, regulando o grupo de genes *HOX*, que influenciam a renovação hematopoiética de células-tronco e a leucemogênese (KRIVTSOV, AMRSTRONG, 2007). Esse tipo de rearranjo é identificado em 5-8% dos pacientes com LLA infantil, se tornando mais frequente em lactantes,

representando 80% dos casos dos pacientes no qual o diagnóstico é realizado antes do primeiro ano de vida (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015).

2.7 ALTERAÇÕES GENÉTICA NA LLA-T

Cerca de 50% dos casos de LLA-T apresentam translocações cromossômicas e a aproximação de oncogenes a regiões promotoras e acentuadoras de genes receptores de células T são comuns (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; WENG et al., 2004; WENG et al., 2004). Mais de 70% das leucemias do tipo T, apontam perda de genes supressores tumorais tais como *P16/INK4* e *P14/ARF*, como resultado das alterações cromossômicas, interferindo também na expressão de genes reguladores que bloqueiam o processo de diferenciação e induz sinais proliferativos que não conseguem ser controlados (BELMONTE et al., 2016).

Foi identificado, em estudos recentes, que o perfil de expressão gênica pode sugerir quatro subtipos principais de LLA-T, baseado em vias de ativação oncogênicas, sendo esses subtipos envolvendo os genes *TLX1*, *LYL1*, *TAL/LMO2* e *TLX3* (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015). A Sinalização NOTCH1 é uma das principais vias de proliferação e sobrevivência das células T (BELMONTE et al., 2016).

Mutações presentes no gene *NOTCH1* vem sendo demonstrada em mais de 60% dos casos de LLA-T, onde a desregulação na sinalização (papel crítico na leucemogênese) de *NOTCH1* pode levar a indução de diversos oncogenes e a inibição de supressores tumorais, eventos esses envolvidos na transformação maligna de precursores de células T e na manutenção da leucemia já estabelecida (BELMONTE et al., 2016; MULLIGHAN, 2016; WENG et al., 2004). Dentre os alvos de *NOTCH1* estão Deltex-1, hey1, hes1 e c-Myc, proteínas responsáveis pela ativação de diferentes vias as quais incluem a via PI3K–Akt/pkb dependente de *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (BELMONTE et al., 2016; WENG et al., 2004).

Algumas mutações que envolvem o braço curto do cromossomo 9, vem sendo detectadas com grande frequência em pacientes com LLA-T (HARRISON; FORONI, 2002). Aproximadamente 80% dos casos de LLA-T e

20% de LLA pré-B apresentam perda dos genes supressores *p16/INK4A* e *p14/ARF* como resultado de deleções no locus 9p21 e adicionalmente, estão hiperexpressando fatores transcricionais oncogênicos *c-Myc*, *nkx2-1*, *nkx2-2* e os genes *LMO1* e *LMO2*; *HOXA*; *TAL1* e *TAL2* (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015).

2.8 TRATAMENTO DA LLA

Um breve histórico mostra as principais formas de intervenções terapêuticas para o tratamento de leucemias, como o uso do arsênio (1865), agentes alquilantes (1943), inserção de protocolos com finalidade de cura (1962) e transplante de medula (1971), mas hoje em dia busca-se adequar e aplicar protocolos de tratamento específicos seguindo as características da leucemia em questão (PEDROSA; LINS, 2002).

Um diagnóstico tardio interfere no acúmulo de mutações nas células clonais, proporcionando assim, uma maior resistência as drogas nas fases iniciais de tratamento (GREAVES, 2002). Por isso a importância de um diagnóstico logo nas fases iniciais da presença de sintomas específicos da doença (PEDROSA; LINS, 2002).

O tratamento da LLA, de uma forma geral, consta de três fases principais: (1) Indução; (2) consolidação da remissão/intensificação e profilaxia da leucemia no SNC; e (3) manutenção sendo cada fase ministrado o uso específico de quimioterápicos (PEDROSA; LINS, 2002; PUI; EVANS, 2006). A quimioterapia pode ser adaptada ao risco de recaída dos pacientes, que é avaliado ao diagnóstico e nas primeiras semanas do tratamento e inclui a poliquimioterapia, baseada na combinação de drogas com diferentes mecanismos de ação (PUI, 2010). Geralmente há uma boa resposta ao tratamento quando há uma menor intensidade de quimioterápicos (SMITH et al., 2006).

Na fase de indução, são utilizados medicamentos como: vincristina, dexametasona, daunorrubicina e asparaginase. Já na fase de consolidação: 6-mercaptopurina, metotrexato, doxorrubicina, vincristina, asparaginase, ciclofosfamida e 6-tioguanina (ROBINSON et al., 2008). E na fase de manutenção: metotrexato, vincristina, dexametasona e 6-mercaptopurina (PUI;

JEHA, 2007). O tratamento é variável de acordo com o grupo de risco do paciente, que dura em média de 2 a 3 anos, e atinge atualmente cerca de 90% de chance de cura (GBTLI, 2000; NIGRO, 2013).

Deve-se também tratar algumas complicações secundárias de pacientes com leucemia que apresentam quadros de hiperuricemia, hipercalcemia, hiperfosfatemia e hipocalcemia (PUI; EVANS, 1998), logo as terapias convencionais ainda estão relacionadas com a possibilidade de desenvolvimento de complicações infecciosas e hematológicas a longo prazo (PUI; EVANS, 2006; PUI; JEHA, 2007). Portanto, novas alternativas de tratamento visam, não somente a cura dos pacientes, mas também a melhora da qualidade de vida dos mesmos (ROBINSON et al., 2008).

É importante ressaltar que a resposta da terapia geralmente depende do comportamento fisiológico do paciente envolvendo: a genética das células leucêmicas, a farmacogenética e farmacodinâmica do mesmo (PUI; EVANS, 2006). E que o sucesso de cura está centralizado principalmente no melhor entendimento da doença, assim como a busca de combinações de novas drogas, e aplicação de protocolos terapêuticos mais adequados (PEDROSA; LINS, 2002).

Sendo assim, se faz necessário a busca e identificação de novos alvos moleculares que possam melhor estratificar os pacientes nos grupos de risco, além de identificação de novos alvos terapêuticos, mais específicos proporcionando um melhor tratamento assim como, prezar pela qualidade de vida dos pacientes.

2.9 RNAS NÃO-CODIFICADORES DE PROTEÍNAS

Tendo em vista a necessidade de identificação de novos alvos moleculares que possam ser utilizados como potenciais terapêuticos, a análise de expressão de ncRNAs vem então se destacando nos últimos anos. Por muito tempo a ciência esteve focada no estudo de sequências de DNA que eram transcritas em RNA e subsequentemente traduzida em uma proteína específica, porém, apenas 2% do genoma humano produz proteínas e, além

disso, estima-se que aproximadamente 97-98% da produção de transcritos do genoma humano seja em ncRNA (MATTICK, 2001; MARINI et al., 2016). Portanto sabemos que a maior parte do genoma humano é constituído por regiões que não codificam proteínas (BEJERANO et al., 2004; MATTICK, 2001; MICHALAK, 2006). Logo, caracterizam-se por ncRNAs transcritos de RNAs que não carregam as informações genéticas de como a proteína deve ser produzida, portanto não é um RNA mensageiro (mRNA) (MORLANDO et al., 2015).

Sabe-se que o número de ncRNAs é muito maior que a quantidade de genes que codificam proteínas, e desempenham funções das mais diversas, sendo importantes na embriogênese; controlam a arquitetura da cromatina, auxiliam em processos de transcrição através da mediação em *splicing* alternativo, participam de processos epigenéticos; promovendo a inativação do cromossomo X, interferem na degradação e tradução do mRNA, entre outras (CHALEI et al., 2014; QUAGLIATA; LUIGI; 2014; MATTICK, 2003).

Além disso, possuem habilidades em formar estruturas secundárias associando-se a complexos proteicos (QUAGLIATA; LUIGI; 2014; RICCARDO et al., 2012;) Os ncRNAs são conhecidos por modular centenas de alvos de mRNA, resultando em alterações globais no fenótipo celular (WANG et al., 2016). Adicionalmente, ncRNAs podem encontrar-se diferencialmente expressos em qualquer tecido tumoral (CHALEI et al., 2014; EMMRICH et al., 2014; MORLANDO et al., 2015), como já observado em amostras de câncer de mama, colorretal, fígado e pulmão e em doenças humanas como diabetes e complicações cardiovasculares, sendo fortemente utilizados como biomarcadores (HAJJARI; ATEFEH; SHIN, 2013; SILVA; BULLOCK; CALIN, 2010; VITURAWONG et al., 2013).

Existem inúmeras classes de ncRNAs, incluindo miRNAs (19-24pb), lncRNAs (>200pb) e lincRNAs (MATTICK, 2003). Os miRNAs estão geralmente associados com a regulação pós-transcricional de mRNAs alvo (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; HE; HANNON, 2004; MENDELL; HEAT, 2005) e a desregulação de expressão dos mesmos pode ainda estar correlacionada ao desenvolvimento e progressão tumoral, podendo atuar como oncogenes ou genes supressores tumorais (CALIN et al., 2004; LU et al., 2005; VOLINIA et

al., 2010).

Já os lncRNAs foram identificados como desregulados em doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, obesidade e principalmente no desenvolvimento e progressão de tumores através da proliferação, invasão, metástase e sobrevivência da célula (CHIBA et al., 2007; DUURSMA et al., 2008; HUNG; CHIU-LIEN et al., 2014; MIRANDA et al., 2006; SILVA; BULLOCK; CALIN, 2015).

Alguns ncRNAs funcionais em processos leucêmicos já foram evidenciados, como os ncRNAs BIC e miRNA-1290 (identificados em certos linfomas em células do tipo B) e os ncRNAs NTT; miRNA196-b, miRNA-101 (identificados em algumas células T ativadas), podendo estar associados a progressão da LLA (QIAN et al., 2016; TORCHIA; MIGEON; SILICIANO, 1997; ZHOU et al., 2017).

2. 10 REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE NCRNAS

Evidências recentes demonstram que alguns ncRNAs possuem regulação transcricional semelhantes a mRNA, para isto a ligação de fatores de transcrição podem estar presentes em regiões promotoras desses transcritos (MATTICK, 2011). Por exemplo, alguns lncRNAs podem ser regulados por fatores de transcrição como o mESCs (mouse embryo stem cells) e Oct4 (octamer-binding transcription fator 4) (MOHAMED et al., 2010).

Estudos utilizando imunoprecipitação corroboraram que há sítios de ligação da RNA Polimerase II e de seus fatores de transcrição mapeados em regiões genômicas distantes de promotores codificadores de proteínas, muitos deles em regiões de lncRNAs (CONLEY; JORDAN, 2012). Também há evidências que alguns lncRNA sejam transcritos pela RNA Polimerase III (MATICK, 2011).

É pertinente que lncRNAs sofram influências e regulação através de mecanismos epigenéticos, sendo que estes eventos incluem a metilação do DNA e modificação de histonas nas regiões próximas de seus sítios de transcrição (CAWLEY, 2004). Durante o processo de diferenciação celular, estas alterações podem influenciar os níveis de regulação de lncRNAs e consequentemente em suas funções (WU et al., 2010).

Estímulos extracelulares também podem influenciar na regulação de ncRNAs, como por exemplo, a regulação por hormônios (YANG et al., 2013), onde os mesmos se ligam a elementos regulatórios na região genômica de lncRNAs (TAKAYAMA et al., 2013).

Recentemente, tem se iniciado o interesse no estudo de lncRNAs transcritos de regiões do DNA altamente conservadas (UCRs) (BEJERANO et al., 2004). T-UCRs foram primeiramente identificados como diferencialmente expressos em processos tumorais por Calin e colaboradores, em 2007, e carregam associações importantes na busca da compreensão da progressão tumoral, logo, a análise de expressão dos mesmos na leucemia linfóide aguda torna-se algo de extrema relevância (CALIN et al., 2007).

2.11 REGIÕES ULTRACONSERVADAS

Em 2004, Bejerano e colaboradores através do estudo da comparação de genomas de mamíferos com aplicações de ferramentas da bioinformática, identificaram que 5% do genoma humano está conservado, potencialmente por serem regiões funcionais (BEJERANO et al., 2004). Este estudo, no primeiro momento, buscava realizar a identificação de regiões homólogas e realizar o agrupamento de algumas proteínas com domínios semelhantes. Feito isso, poderiam ser sugerido possíveis funções a regiões até então desconhecidas em outras espécies.

Analisando então regiões perfeitamente conservadas, maiores de 200 pb e idênticas quando comparados os genomas de ratos, camundongos e humanos, foram identificadas 481 regiões, as quais chamaram de (UCRs) (BEJERANO et al., 2004). Posteriormente, observou-se alta similaridade dessas regiões também em outros mamíferos e até em grupos mais distantes evolutivamente, como peixes; aves; plantas e insetos, o que sugere uma forte pressão seletiva positiva na região e importante papel biológico (BEJERANO et al., 2006; TACCIOLI, CRISTIAN, et al 2009).

No genoma humano, essas regiões estão mapeadas em diversos *loci* e estão ausentes apenas no cromossomo Y e 21, talvez por se tratarem de cromossomos com a menor quantidade de sequências gênicas essenciais

(MARTÍNEZ et al., 2010).

A primeira anotação das sequências UCRs foi feita com enfoque na busca por regiões relacionadas com a síntese proteica e descreveram que destas 481 UCRs, 111 são exônicos, pois sobrepõem um mRNA no genoma humano, 256 UCRs são caracterizadas como não exônicos e não apresentam evidências com processo de transcrição e 114 UCRs são intergênicas (BEJERANO et al., 2004; MCLEAN; CORY; BEJERANO, 2008).

Como essa primeira anotação foi baseada na versão hg17 do genoma humano, posteriormente, com base na versão hg18, essas regiões foram reclassificadas em: intergênicas (38,7%), intrônicas (42,6%), exônicas (4,2%), parcialmente exônicas (5%) e contendo o exón (5,6%). Ainda para um pequeno grupo dessas T-UCRs (3,9%) a anotação genômica varia por causa de *splicing* alternativo no gene hospedeiro (MESTDAGH et al., 2010).

Os UCRs intergênicos, geralmente estão mapeados em “desertos gênicos” e os genes mais próximos que estão mapeados flanqueando essas regiões, geralmente estão relacionados com o desenvolvimento, sugerindo que talvez essas regiões UCRs intergênicas, atuem como acentuadores distais de controle gênico (CORY; BEJERANO, 2008). Por exemplo, a região uc.351 contém um acentuador mapeado a 225 kb do gene *DACH*, conhecido por seu desenvolvimento no cérebro, membro e órgãos sensoriais (SCARUFFI, 2011).

A alta conservação das UCRs sugerem um importante papel biológico dessas regiões, no entanto, as suas funções específicas ainda não são completamente conhecidas (HUDSON et al., 2013). Adicionalmente, muitas dessas UCRs incluem-se na imensa parcela do genoma que não dão origem a proteínas e que por muitos anos foi considerada como “DNA lixo” e atualmente evidenciadas como a grande explicação para a complexidade das células eucarióticas, principalmente nos mecanismos de regulação gênica (BEJERANO et al., 2004; MCLEAN; CORY; BEJERANO, 2008).

Em 2007, em um trabalho precursor sobre o tema, Calin e colaboradores identificaram que muitas dessas UCR são transcritas, os chamados T-UCRs. Mais especificamente, 34% dessas UCRs tinham expressão universal, estando expressos em 19 diferentes tipos teciduais humanos (CALIN et al., 2007). Muitos desses T-UCRs possuem estruturas secundárias potencialmente

funcionais e/ou são transcritos em clusters com outros ncRNAs de comprovada importância celular (BEJERANO et al., 2004; CALIN et al., 2007).

Adicionalmente, nesse mesmo trabalho, foi descrito um perfil de expressão dos T-UCRs característico à LLC e aos carcinomas hepatocelular e colorretal, capazes de diferenciar cada subtipo tumoral das outras neoplasias e também de sua contraparte normal, sendo então associados com o diagnóstico e prognóstico (CALIN et al., 2007). Esse trabalho descreveu que cada tipo de câncer analisado apresenta um conjunto de T-UCRs alterados, quando comparado com células normais do mesmo tecido, e sugere que essas regiões possam estar envolvidos em processos malignos e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico do câncer (SCARUFFI, 2011).

Enfatizando a importância das UCRs no processo neoplásico, muitas dessas regiões estão frequentemente mapeados em sítios frágeis, regiões genômicas já associadas ao câncer (CALIN et al., 2007). Adicionalmente, a desregulação de alguns T-UCRs também foi descrito em neuroblastoma pediátrico, inclusive sendo relatada uma associação de alguns com características genéticas e com prognóstico (SCARUFFI et al., 2009; MESTDAGH et al., 2010).

Em 2010, foi identificado que o perfil epigenético de regiões genômica próxima a três T-UCRs (uc.160, uc.283, uc.346) estavam alterados em uma linhagem de tumor de cólon em relação ao tecido normal (LUJAMBIO et al., 2010). Nesse trabalho, também verificou-se que esse perfil epigenético anormal é similarmente encontrado em 59 diferentes linhagens celulares neoplásicas, entre esses 6 linhagens de LLA infantil (Jurkat, Molt 16, ReH, KOPN-8, Molt 4) (LUJAMBIO et al., 2010).

Também foram evidenciadas duas regiões T-UCRs diferencialmente expressas, as UCRs uc.73 e uc.388, em carcinoma colorretal, sendo caracterizados como potenciais marcadores moleculares auxiliando no diagnóstico e prognóstico do câncer em questão (SANA et al., 2012).

A desregulação dos T-UCRs também foi confirmado em hepatocarcinoma (BRANCONI et al., 2011), tumor colorretal (SONA et al., 2012), próstata (HUDSON, 2013), neuroblastoma (MESTDAGH et al., 2013), câncer hepatocelular (KOGURE et al., 2013), câncer de esôfago (FASSAN et

al., 2014), câncer de próstata e câncer gástrico (GOTO et al., 2015), tumores medulares (JIANG et al., 2016), câncer de mama (MARINI et al., 2016), adenocarcinoma pancreático (JIANG et al., 2016), câncer de cólon (KAJITA et al., 2016) e câncer de bexiga (OLIVIERI et al., 2016).

Além das evidências em amostras tumorais, a desregulação dos T-UCRs foram relatados na doença de Crohn, um tipo de doenças Inflamatória intestinal grave. Nessa doença, a hiperexpressão da região uc.261 foi associada ao aumento de dano tecidual no processo inflamatório nas mucosas (QUIAN et al., 2016). Um outro grupo analisou a exposição e absorção de chumbo como atenuante agente de toxicidade ao SNC, sugeriu que uc.173 desempenha um papel importante na inibição da apoptose na lesão nervosa induzida por chumbo em ratos (NAN et al., 2016).

Embora muitos trabalhos demonstrem os T-UCRs com diferença de expressão, o papel biológico das UCRS no genoma ainda é pouco descrito. De forma geral, sabe-se que podem atuar como acentuadores distais no processo de regulação gênica (MARTÍNEZ et al., 2010), reguladores de *splicing* (NI et al., 2007) e atuar na regulação de modificações epigenéticas (LIN et al., 2012), mas detalhes moleculares da função de cada região ainda precisa ser melhor elucidada. Esses trabalhos prévios descrevendo as alterações na expressão das UCRs em amostras tumorais, além da evidente conservação dessas regiões, sugerem que os T-UCRs desempenham uma função de grande importância em mamíferos e outros vertebrados, entretanto, ainda grandemente desconhecida. Já a investigação dessas moléculas como marcadores tumorais, tanto no diagnóstico precoce da doença como na estratificação de grupos de risco, tem se mostrado cada dia mais promissoras.

Na LLA, não foi encontrado nenhum trabalho que analisa o perfil de expressão de qualquer UCR em amostras de MO de pacientes, embora em destaque que o maior número dos T-UCRs expressos foi encontrado em linfócitos (CALIN et al., 2007; SHEN et al., 2011). E visto a grande heterogeneidade dessa neoplasia e a necessidade de busca alternativa de novos marcadores capazes de melhor estratificar os pacientes nos grupos de risco, a análise de expressão dos T-UCRs na LLA infantil se torna grandemente importante. Adicionalmente, são poucas as associações de T-UCRs com

parâmetros biológicos e clínicos importantes no desfecho prognóstico de leucemias.

Sendo a desregulação de T-UCRs uma característica de outros tipos tumorais humano, podendo ser associados com diagnóstico, prognóstico e resposta a tratamento, é importante que essas regiões sejam melhor investigadas. Como são muitas UCRs descritas, o presente trabalho propôs iniciar as análises de expressão de T-UCRs por aqueles intergênicos, ou seja que são considerados lincRNAs identificados como desregulados em pacientes com LLC ou em tumores sólidos, embora se conheça a grande heterogeneidade nos perfis de expressão gênica de cada tipo neoplásico. Com isso busca-se encontrar neste trabalho pioneiro a associação da expressão de alguns lincRNAs identificados em T-UCRs com características biológicas e clínicas dos pacientes pediátricos com LLA.

3 OBJETIVOS

Serão apresentados nesta sessão os objetivos gerais e específicos relacionados à pesquisa, sendo estes:

3.1 OBJETIVO GERAL

- a) Analisar a expressão de T-UCRs (uc.112, uc.122, uc.160, uc.252, uc.262 e uc.316) em amostras de medula óssea de crianças e adolescentes com LLA. E realizar uma possível associação com parâmetros clínicos de rotina clínica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a expressão dos T-UCRs (uc.112, uc.122, uc.160, uc.252, uc.262 e uc.316) em amostras de medula óssea, colhidas ao diagnóstico, de crianças e adolescentes com LLA;
- b) Analisar a possível associação dos níveis de expressão dos T-UCRs com características biológicas e clínicas dos pacientes como: idade, contagem de leucócitos ao diagnóstico, imunofenótipo, presença de t(12;21) e hiperdiploidia;
- c) Analisar a possível associação dos níveis de expressão dos T-UCRs com sobrevida dos pacientes LLA;
- d) Avaliar, através de ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos, o alinhamento das sequências de UCRs de maior interesse e mecanismos regulatórios existentes em sequências adjacentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados foram:

4.1 PACIENTES COM LLA

Foram incluídas no estudo amostras de medula óssea de 58 crianças e adolescentes, com LLA, colhidas ao diagnóstico e que posteriormente foram tratadas integralmente de acordo com protocolo GBTLI-99, com participação voluntária e atestada em termo de consentimento (CONEP, No. 7329/2009).

Essas amostras são provenientes de dois centros, o HCFMRP-USP, em Ribeirão Preto-SP e Instituto Boldrini, em Campinas-SP. Todas as amostras estão armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Pediatria, HCFMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli.

O diagnóstico da leucemia se baseou na análise morfológica, imunofenotipagem por citometria de fluxo, cariotipagem por bandamento G e da análise das principais translocações cromossômicas por RT-PCR (VAN et al., 1999).

Também foram analisadas 10 amostras de medula óssea de crianças livres de doenças hematológicas que foram submetidas à cirurgia cardíaca. Essas amostras fazem parte do Banco de MO (Proc HC 9373/2003) do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dentre os pacientes analisados, 63,1% (n=36) foram diagnósticas com idade entre 1 a 9 anos e 36,9% (n=21) eram menores de 1 ano ou maiores de 9 anos. Com relação a contagem de leucócitos ao diagnóstico, 50,9% (n=29) tinham contagem $<50.000/\text{mm}^3$ e 49,1% (n=28) apresentavam $\geq 50.000/\text{mm}^3$. 57,9% (n=33) dos pacientes eram LLA-B e 42,1% (n=24) tiveram diagnóstico de LLA-T. Com relação à análise citogenética, dos pacientes com LLA-B, 21,2% (n=7 de 33) apresentavam a translocação t(12;21) e 25% eram hiperdiploides, com mais de 50 cromossomos (n=5 de 20).

A remissão clínica completa foi definida como presença de quantidade inferior a 5% de blastos leucêmicos na medula óssea, analisados por citologia

convencional, e ausência de sintomas ou sinais físicos atribuíveis à leucemia no vigésimo oitavo dia da indução (GBTLI, 1999). Vinte e um pacientes (ou 36,8% dos casos) apresentaram algum evento desfavorável ao longo do período de observação verificado, incluindo recaída da doença ou óbito.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA

Para o presente estudo, todas as amostras de RNA já estavam previamente extraídas e armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Pediatria, HCFMRP-USP.

As amostras foram extraídas com reagente TRIZOL™ (Thermo Fisher), seguindo recomendações do fabricante.

Para as análises, as amostras foram requantificadas, utilizando espectrofotômetro NanoDrop.

4.3 ANÁLISE DE INTEGRIDADE

Por se tratar de análises de expressão de RNAs longos, é essencial que se garanta a integridade das amostras biológicas a serem analisadas, pelo fato destas amostras terem sido coletadas há algum tempo e utilizadas em outras pesquisas.

Para a verificação de integridade do RNA das amostras de MO, foi utilizado 1µL de RNA (100ng/µL) em equipamento *Agilent 2100 BioAnalyzer* (Agilent Technologies) que verifica a relação entre as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal e atribui uma nota baseada na integridade do RNA total (RNA Integrity Number – RIN), que varia de 1 a 10. Neste estudo foram consideradas como íntegras as amostras de RNA que apresentaram uma relação entre as bandas 28S e 18S superior a 1 e/ou RIN > 7.

A análise de integridade das amostras foi feita no Núcleo de Análise Genômica da FMRP-USP.

4.4 TRATAMENTO COM DNASE E SÍNTESE DE CDNA

Por se tratar de análises de expressão de RNAs longos, é essencial que se garanta a integridade das amostras biológicas a serem analisadas, pelo fato destas amostras terem sido coletadas há algum tempo e utilizadas em outras pesquisas.

Para a verificação de integridade do RNA das amostras de MO, foi utilizado 1µL de RNA (100ng/µL) em equipamento *Agilent 2100 BioAnalyzer* (Agilent Technologies) que verifica a relação entre as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal e atribui uma nota baseada na integridade do RNA total (RNA Integrity Number – RIN), que varia de 1 a 10. Neste estudo foram consideradas como íntegras as amostras de RNA que apresentaram uma relação entre as bandas 28S e 18S superior a 1 e/ou RIN > 7.

A análise de integridade das amostras foi feita no Núcleo de Análise Genômica da FMRP-USP.

4.5 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

A análise da expressão gênica foi realizada a partir da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR), utilizando o corante SYBR Green® (Applied Biosystems) em equipamento ABI PRISMTM 7500 Sequence Detection Systems (PE Applied Biosystems).

Previamente as análises de expressão, foi realizada a análise de eficiência dos primers. Essa análise é importante pois confirma se os primers são capazes de amplificar eficientemente as sequências alvo e ainda nos dá uma informação global se essas regiões são expressas nas linhagens específicas.

Para a análise de eficiência dos primers foi utilizado um *pool* de cDNAs de linhagens derivadas de LLA (ReH, JURKAT, NALM6 e MOLT-4). A partir de uma primeira diluição do cDNA de 1:20 foram feitos 5 pontos de diluição seriada: 1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16.

Os pontos da curva foram amplificados, em triplicata, em solução com 5µL de master mix 10x (contendo tampão, dNTPs, Amplitaq Gold, MgCl₂ e

ROX como referência passiva) e 0,5 μ L do par de primers (10mM). Após amplificação, uma curva de regressão linear foi feita e a inclinação da reta (slope) foi utilizada para verificar a eficiência, que deveria estar próxima de 100% (de 90 a 110% foram aceitos). Sendo considerado também o coeficiente de correlação R^2 próximo a 1,00. Esses cálculos foram automaticamente realizados pelo software de análise do equipamento ABI PRISMTM 7500. A sequência de todos os primers utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Sequências dos primers usados nas reações de quantificação por PCR em Tempo real.

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento	Referência
GUS	5' GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT/ CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA 3'	101pb	Mata et al., 2006
GAPDH	5'AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG/ GGCAGAGATGATGACCCTTTT 3'	130pb	Valente et al., 2009
uc.112	5'TGACAGCGAAACACACCTGTA/ CAACACTCTGTGCCCCATTA 3'	134pb	Calin*
uc.122	5' CAGCTGGGAAATTCTGGAGT/ ACTGACCCACATTTGGACCT 3'	116pb	Calin*
uc.145	5'GCGTGGATGGGAATTTCTA/ TCTCGGTTATTTACAGGCA 3'	102pb	Calin*
uc.160	5'GGCTTCAATGCACTATTGCA/ AAACCCTCCCTTGCTGACA 3'	95pb	Calin*
uc.198	5' AGAGTCAAGGTGATGGCCAT/ ACTGGCTGCACAGCTTGAT 3'	116pb	Calin*
uc.252	5'GCTCATCACAGGACCCACA/ AAGCCCAGCCAATTAAGGA 3'	97pb	Calin*
uc.262	5'AGGCTGAGGGTTCCTAATGA/ TGTAATTGTTGCACCCTCTT 3'	110pb	Calin*
uc.396	5'ATGGCTACATGGGCCATTA/ GCTGTGCAAGATGCACCA 3'	108pb	Calin*
uc.399	5'TGCCCTATTAGGGTAAGTTT/ CTGACAATTAACAAAAGCTTC 3'	87pb	Calin*

2

² Fonte: Calin, Mata, Valente .

Nota: Primers uc. Desenhados e gentilmente cedidos pelo grupo do Prof. Dr. George Calin, MD Anderson

As reações ocorreram em meio contendo 4,5µL de cDNA diluído 20 vezes, 5µL de master mix 10x(contendo tampão, dNTPs, Amplitaq Gold, MgCl₂ e ROX como referência passiva) e 0,5µL do par de primers (10mM). Cada amostra de paciente foi amplificada em triplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não exceda meio ciclo ($d < 0,5$).

Foi utilizado o método de quantificação relativa, o qual sinaliza a mudança de expressão do gene alvo em relação a uma amostra de calibrador, que nesse caso foi a linhagem ReH, incluída em todas as placas. Como controle endógeno foi utilizada a expressão do gene *GUS* e *GAPDH*, e a quantificação relativa foi obtida pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo Ct o ciclo em que o nível de fluorescência alcançou o limiar pré-estabelecido (threshold).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises preliminares de um ensaio piloto com 18 amostras de LLA, selecionadas aleatoriamente, foram utilizadas para fazer o cálculo do tamanho da amostra.

Todo estudo clínico para ser válido deve ser metodologicamente rigoroso, visando minimizar erros de investigação, sendo assim foi realizado uma estimativa do tamanho da amostra com relação ao estudo que desejava ser realizado para determinada análise dos níveis de expressão gênica visando sua comparação com os parâmetros clínicos (principalmente subtipos B e T) na LLA.

Alguns erros existem nas análises estatísticas, logo, erros tipo I (falso-positivo) ou α (Alfa), é a probabilidade de que o teste estatístico demonstre que existe uma relação estatisticamente considerável quando na verdade a mesma não é existente, este teste proporciona também verificar quando é rejeitada uma hipótese nula quando na verdade não deveria (CARNEIRO, 2003). Um erro do tipo α neste estudo foi de 0,05%, fixando-se um valor de $P < 0.05$.

Erros do tipo II (falso-negativo) ou β (Beta), visa minimizar a probabilidade de quando realizado o teste estatístico e o mesmo diz que não existe uma significância estatística e na verdade essa diferença existe. É geralmente estabelecido em 20%, este então, é considerado o valor de Beta. E

para sua análise estatística é considerado 1 menos Beta, em definição $1 - 0,2 = 0,8 = 80\%$, fixado como valor de poder de teste (CARNEIRO, 2003).

Os erros tipo I e II não podem ser evitados por completo, porém podem diminuir a probabilidade aumentando a dimensão da amostra do estudo, então, considerando que o tamanho da amostra depende tanto de Alfa quanto de Beta, quanto menor forem seus valores, maior deverá ser o tamanho da amostra viável para rejeitar uma hipótese nula ou para demonstrar que realmente houve uma associação estatisticamente com um determinado valor de significância, e com isso determina-se o poder de um estudo (CARNEIRO, 2003).

Já se conhece que dados de expressão gênica nem sempre seguem uma distribuição normal e deve-se utilizar para análise de associações preferencialmente teste não paramétricos. Porém, diferentemente das análises paramétricos, o teste de tamanho efetivo da amostra e poder de teste para análises não paramétricas é pouco conhecida.

Para realização dessa abordagem, contamos com a colaboração da Profa. Msc. Vanessa Bielefeldt Leotti Torman, do departamento de estatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O teste de tamanho amostral foi calculado no programa PASS 11, fixando-se um poder de teste em 80% e baseado nas análises preliminares da associação entre o imunofenótipo B e T, nossa associação de maior interesse inicialmente.

Posteriormente, com o conjunto de pacientes analisados buscou-se por associação entre o nível de expressão das regiões uc.112, uc.122, uc.160 e uc.262 em relação aos parâmetros clínicos: idade, contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico, imunofenótipo e presença da translocação t(12;21) ou hiperdiploidia.

A análise da associação entre os níveis de expressão e características clínicas foi realizada através de testes não paramétricos Mann-Whitney. Variáveis contínuas foram analisadas usando categorias discretas previamente estabelecidas.

Para a análise de sobrevida foram consideradas os seguintes dados: diagnóstico, alcance da remissão (remissão clínica), recaída, óbito ou perda de seguimento. A análise da sobrevida foi avaliada através de curvas de Kaplan-

Meier e teste de log-rank.

As análises estatísticas foram executadas no programa SPSS 22.0 com nível de significância considerado de 5% ($P < 0,05$).

4.7 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

E para comparação das sequências de nucleotídeos das UCRs de maior interesse, região uc.112 e uc.160, foi utilizado a plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Na aba “Web BLAST” “(Nucleotide BLAST)”, “BLAST®» blastn suíte”, foi utilizado a sequência das regiões uc.112 e uc.160, e a busca no banco de dados foi utilizado o filtro de busca de “Nucleotide Collection (nr/nt)”, pareado com o genoma de “*Homo sapiens* (taxid:9606)”, otimizado para seqüências altamente semelhantes “(megablast)”.

Para ambas regiões analisadas, nenhuma relação entre a sequência de nucleotídeos predeterminadas foi relacionada ao processo de transcrição de vias proteicas.

A sequência de nucleotídeos das regiões ultraconservadas uc.112 e uc.160 estão descritos na tabela 2.

Tabela 2- Sequência de nucleotídeos das regiões uc.112 e uc.160 utilizados para análises de Bioinformática.

Região UCR	Sequência	Tamanho do Fragmento	Referência
	>uc.112+		
Uc.112	GTGTGTGTCATTTACAAATGCAAAGATAACAGCA AGTTCTTAGTTGGCACCAAATGGGGGACCGTTA AGTATGAGAAATGATGTCGATTTATCATTATATTA TGCCTCTGACAGCGAAACACACCTGTACTTTTT ATGTAATTTATTGACTGGTTATAGATGCTGTGCG AGAGAGGAAAAAATTAGCGCAGCTTTAATTACT CATGCTGCTGGTAAAATATTAATGGGGCACAG AGTGTTCATGCTCATTCTGTTGATTTTTAATTA GCAGTAATTCATTTGCACAAAGCATGTTGATGC CTTTGCCGAGACATTAGCGAAGAAGCTGAATA AAGATGTTT	346pb	Bejerano et al., 2004
	> uc.160+		
Uc.160	AGTAAATGAGGCGAGTGTGCAAATGACTCCTT TCTGAACCAAACGGCATGCTCCGTGCTGGGGA AATGAGATGCACATTTAAATCTCATCCATCCACC GCCTGCGGCCACCGCCATGTACCTGCCTACTTA GCCCAAGGGTTAATTAATTGAGGCTTCAATGCA CTATTGCAAGAGCATTATTGCATTTGATACTCTA CATCTGTGATTTAAACTCTTTCAGTCCCTTGTC AGCAAGGGAGGGTTTTTAACTAGGAAATTAGCA TTCAGATAAGGGAACGCTCTATTTGCTTCTGAAA GGAAGGAAATATTAAGGATGCT	322pb	Bejerano et al., 2004

Uma análise de bioinformática também foi realizada na plataforma Genome Browser, University of California Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>). Utilizando a versão GRCh37/hg19 do genoma humano as posições das regiões uc.112 (chr3:18169564-18169909) e uc.160 (chr5:77268844-77269165) foram analisadas.

Para a análise, na aba de “regulação gênica” os controles para a exposição de “Regulação integrada do ENCODE”; “ilhas CpGs”, Interações de cromatina do ENCODE”, “modificações de cromatina”, “metilação de DNA”, “proteínas de ligação ao RNA”, “sítios de miRNAs”, “ligação de fatores de

transcrição conservados”, “acentuadores”. Observados especificamente da sequência ultraconservada e com uma diminuição de zoom de 3x (para análise de elementos de regulação em sítios adjacentes).

5 RESULTADOS

Segue abaixo os resultados obtidos :

5.1 ANÁLISE DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS

A eficiência dos primers: uc.112, uc.122, uc.145, uc.160, uc.198, uc.252, uc.262, uc.316, uc.396 e uc.399 foram avaliados. Dentre estes primers, seis apresentaram uma curva padrão dentro dos parâmetros exigidos, ou seja, possuíram uma eficiência próxima a 100% e um R^2 próximo a 1,00. Estes primers foram: uc.112, uc.122, uc.160, uc.252, uc.262 e uc.316.

As regiões amplificadas pelos primers uc.145 e uc.396, apresentaram pouca expressão, sendo que a análise de eficiência dos primers não se apresentou dentro dos parâmetros ideais. Adicionalmente, a região amplificada pelo primer uc.399 não teve nenhum nível de sinal detectado, indicando que a região não é expressa no pool de linhagens de LLA analisados. Ainda o primer Uc.198 apresentou um padrão de amplificação bem diferente, sugerindo problemas. Assim sendo, nenhuma dessas quatro regiões foi analisada no presente trabalho.

5.2 EXPERIMENTO PILOTO

Para início da análise das regiões com primers de eficiência comprovada nos pacientes com LLA, foi realizado um experimento piloto (pré-análise) com 18 amostras aleatórias de MO diagnosticados com LLA. Das seis regiões analisadas, 95% tiveram expressão detectável para a região uc.112, 100% para uc. 122, 72% para a região uc.160, 28% para uc.252, 83% para uc.262 e 44% uc.316.

Baseado nesses resultados preliminares, as regiões uc.252 e uc.316 não foram detectados na maioria dos pacientes, o que impossibilitaria uma análise mais detalhada de associação clínica, portanto, não foram analisadas na próxima etapa do trabalho.

Esse experimento piloto também foi utilizado para fazer o cálculo do tamanho da amostra de nosso estudo, visto é essencial que se tenha uma

informação prévia do nível de variabilidade dos dados para esse cálculo.

- a) Para associação da uc.112 vs. Subtipo T, teríamos de analisar no mínimo 22 amostras;
- b) Para associação da uc.122 vs. Subtipo T, teríamos de analisar no mínimo 54 amostras;
- c) Para associação da uc.160 vs. Subtipo T, teríamos de analisar no mínimo 45 amostras.

É indicado, portanto, se escolher o maior dos valores de tamanho amostral mínimo, que seria de 54 amostras. Incluímos mais alguns pacientes, visto que em nossos ensaios preliminares algumas amostras não expressam a região analisada e eram excluídas das análises de associação, portanto foi definido o tamanho amostral final de 58 pacientes.

5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS LLA EM RELAÇÃO ÀS MEDULAS NÃO TUMORAIS

Na análise de amostras de MO de pacientes com LLA trabalhamos com mais de 90% das células derivadas de clones leucêmicos, na sua grande maioria apresentam um ou poucos tipos de blastos, já comprometidos com uma etapa da diferenciação hematopoiética, portanto, a maioria das células apresentam os mesmos marcadores de superfície celular.

Na medula óssea temos um conjunto de diferentes células, com graus de maturação distintos, e por isso essa amostra não é considerada a contraparte normal da LLA. Porém, mesmo sem ser o objetivo principal do trabalho, a análise de expressão das amostras de LLA em relação à medula óssea serve para se ter uma visão geral do perfil de expressão no conjunto das células hematopoiéticas em relação às leucêmicas.

Através da análise de expressão das T-UCRs uc.112, uc.122, uc.160 e uc.262 em amostras de MO não tumoral em relação as amostras de MO com diagnóstico de LLA, a região uc.112 estava com expressão aumentada no

grupo dos pacientes ($P=0,009$) e a região uc.262 foi encontrada diminuída nos pacientes ($P=0,02$). Não foi encontrado diferenças significativas nas regiões uc.122 e uc.160 (Figura:1)

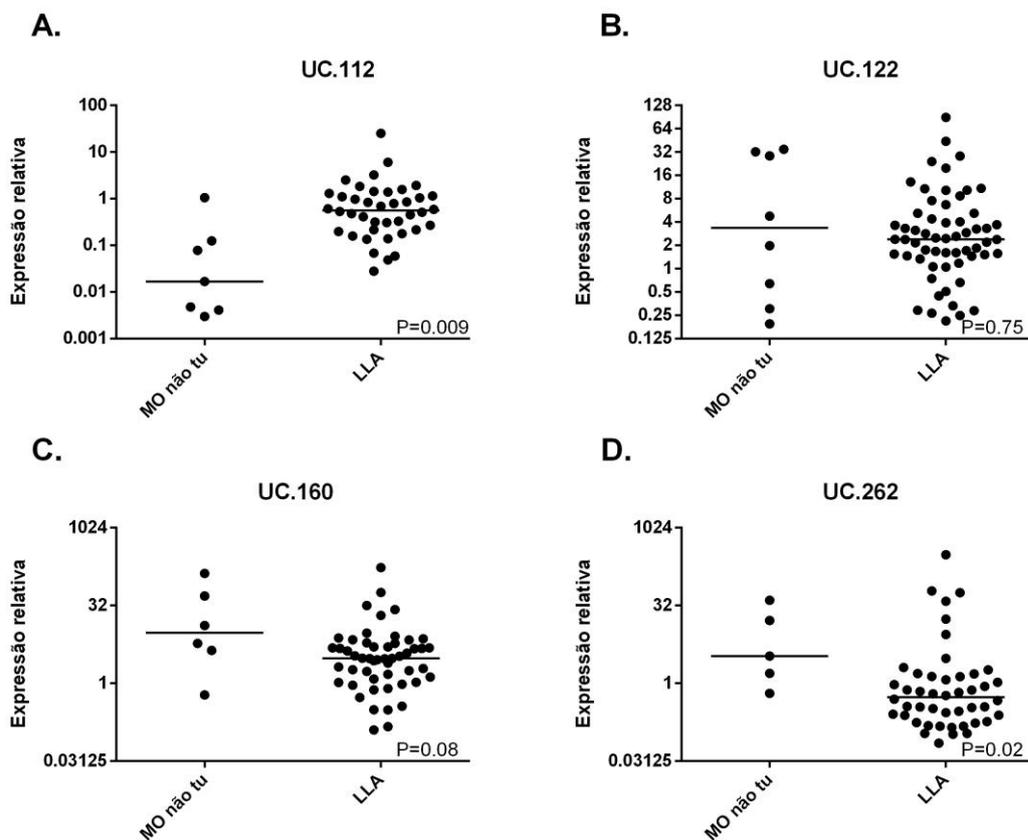


Figura 1 – Análise da expressão das regiões uc.112 (A), uc.122 (B), uc.160 (C) e uc.262 (D). MO não tu = amostra de medula óssea não tumoral e LLA = amostras de medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda. A linha vertical indica a mediana. Teste estatístico: Mann-Whitney.

Fonte – Do Autor.

5.4 ASSOCIAÇÃO DAS T-UCRS COM PARÂMETROS CLÍNICOS

A expressão das T-UCRs foi avaliada em relação a idade dos pacientes, contagem de glóbulos brancos (GB) ao diagnóstico, imunofenótipo e presença de t(12;21) ou hiperdiploidia (Tabela 3).

Com relação ao imunofenótipo, identificamos que a região uc.112 (P=0,03) e a região uc.160 (P=0,01) encontraram-se aumentadas nos pacientes LLA-T, fenótipo relacionado a um pior prognóstico, em relação aos pacientes LLA-B (Figura 2).

Dentro do grupo de pacientes LLA-B, os pacientes foram avaliados citogeneticamente com relação à presença de translocações e aumento na contagem cromossômica e foram estratificados em relação a presença ou não da t(12;21) e em relação a presença ou ausência de hiperdiploidia.

Com relação a presença de hiperdiploidia (Figura 3), a região uc.112 (P=0,004) estava aumentada no grupo de pacientes positivos >50Ch, grupo esse considerado de melhor prognóstico. Não foi encontrada associação na análise de pacientes com LLA-B e positivos para t(12;21), relacionada ao melhor prognóstico, e pacientes LLA-B sem essa translocação.

Para essa análise da possível associação com idade, os pacientes foram estratificados em dois grupos: com idade ao diagnóstico entre 1 a 9 anos, considerada uma faixa etária de melhor prognóstico; e pacientes com idade inferior a 1 ano ou superior a 9 anos, faixa relacionada a um pior prognóstico, porém nenhuma associação foi evidenciada.

Com relação a contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico, os pacientes foram estratificados em contagem <50.000mm³ ou com contagem >50.000mm³, o último sendo classicamente considerado o grupo de pior prognóstico. Com relação a esse parâmetro, também não encontramos associação com nenhuma das T-UCRs analisadas.

Tabela 3 - Associação entre o nível de expressão dos T-UCRs uc.112; uc.160; uc.122 e uc.262 e parâmetros clínicos e biológicos em pacientes com LLA (Teste Mann Whitney).

Parâmetros	T-UCR uc.112 mediana (min-max)	Valor P	T-UCR uc.122 mediana (min-max)	Valor P	T-UCR uc.160 mediana (min-max)	Valor P	T-UCR uc.262 mediana (min-max)	Valor P
Idade								
>1 a <9	0,56 (0,05-25,19)	1,000	2,45 (0,50-10,29)	0,941	3,05 (0,80-26,70)	0,168	0,35 (0,10-3,05)	0,633
<1 a >9	0,70 (0,028-3,25)		1,75 (1,19-10,91)		4,75 (0,30-32,10)		0,52 (0,07-2,03)	
GB ao diagnóstico								
<50.000/mm ³	0,82 (0,02-25,19)	0,411	2,45 (0,50-10,92)	0,708	3,85 (0,80-32,12)	0,435	0,35 (0,07-2,03)	0,767
>50.000/mm ³	0,51 (0,05-6,07)		2,39 (0,75-5,20)		2,85 (0,30-9,39)		0,50 (0,10-3,05)	
Categoria T								
negativo	0,43 (0,05-1,44)	0,035	2,39 (1,60-3,13)	0,221	2,48 (0,93-4,69)	0,012	0,59 (3,05-0,28)	0,734
positivo	0,95 (0,03-25,20)		2,67 (1,75-7,60)		4,80 (1,95-26,70)		0,35 (0,25-0,35)	
t(12;21)								
positivo	0,49 (0,05-1,44)	0,211	2,39 (1,60-3,13)	0,437	2,98 (0,93-4,69)	0,221	0,33 (3,05-0,28)	0,665
negativo	0,19 (0,06-0,60)		2,12 (1,85-2,39)		1,46 (1,70-3,42)		0,63 (0,67-0,50)	
Hiperdiploidia (>50Ch)								
positivo	0,30 (0,98-0,20)	0,004	2,15 (1,62-1,05)	0,497	1,78 (2,98-0,93)	0,559	0,54 (0,10-3,05)	0,441
negativo	1,10 (0,46-1,44)		2,40 (2,39-3,12)		3,05 (1,05-4,69)		0,75 (0,33-0,28)	

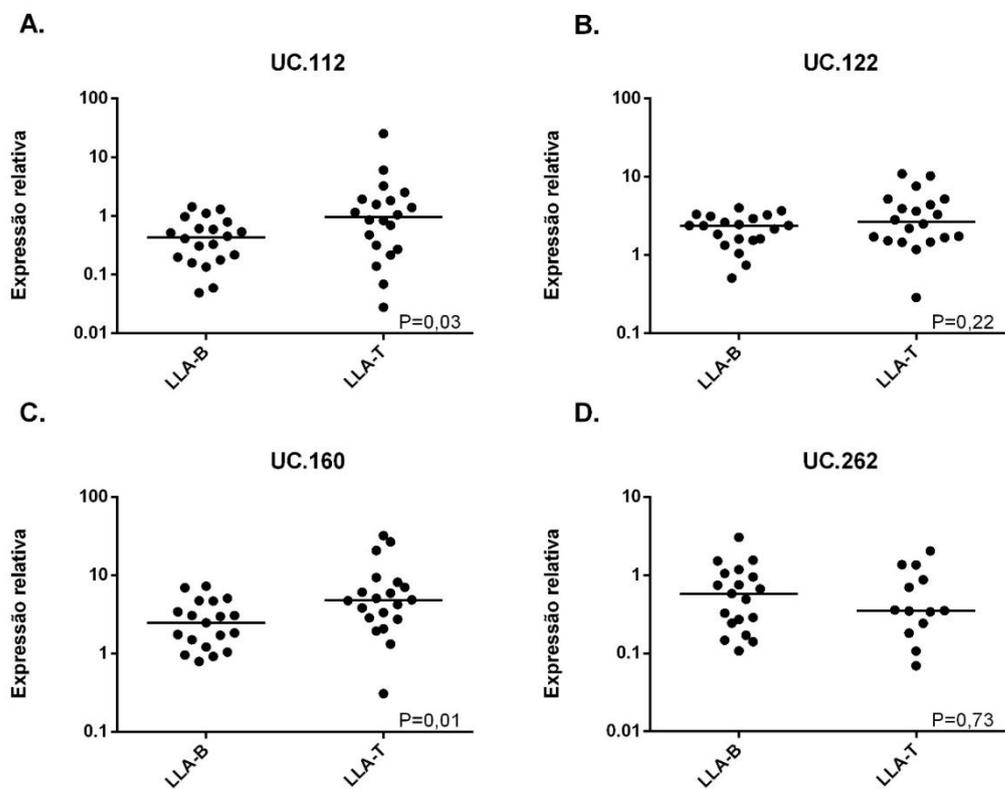


Figura 2– Análise da expressão das regiões uc.112(A), uc.122(B), uc.160(C) e uc.262(D). LLA-T=amostras de medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda de células T, e LLA-B=amostras de medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda de células B. A linha vertical indica a mediana. Teste estatístico: Mann-whitney

Fonte- Do Autor

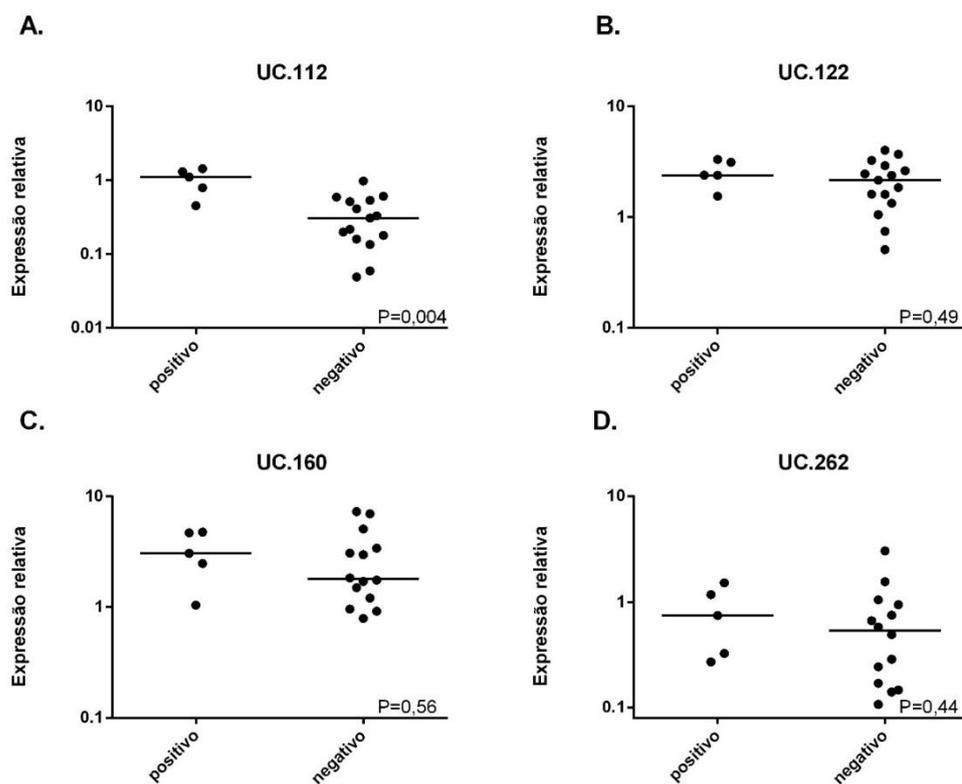


Figura 3 – Análise da expressão das regiões uc.112(A), uc.122(B), uc.160(C) e uc.262(D). Positivo=pacientes com presença de hiperdiploidia e negativo=pacientes com ausência de hiperdiploidia. A linha vertical indica a mediana. Teste estatístico: Mann-Whitney.

Fonte- Do Autor.

5.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE EVENTOS

Para a análise de sobrevida, os pacientes foram separados em dois grupos. Os que apresentavam as maiores expressões de T-UCR em relação à mediana, e o grupo com os menos expressos. Na análise de sobrevida total livre de qualquer evento (recaída ou óbito), nenhuma das regiões analisadas foi estatisticamente associada (Figuras 4-7).

Embora sem diferenças significativas, a região que mais se aproxima de uma possível associação com sobrevida é a região uc.112 (P=0,06) (Figura 4), sugerindo que uma maior expressão dessa região pudesse estar relacionada com uma menor sobrevida. Porém, nossos dados experimentais não foram suficientes para sugerir essa associação.

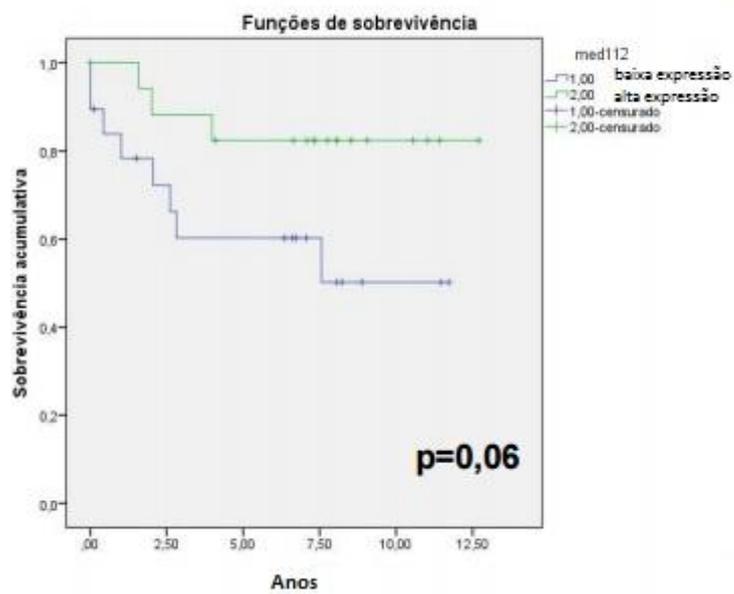


Figura 4 – Análise de sobrevida dos pacientes com LLA associado a análise de expressão gênica dos transcritos da região uc.112.

Fonte- Do Autor.

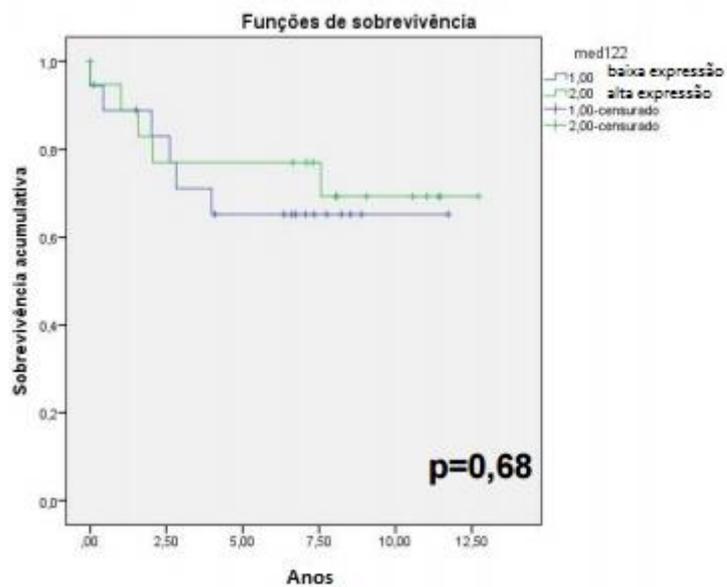


Figura 5 – Análise de sobrevida dos pacientes com LLA associado a análise de expressão gênica dos transcritos da região uc.122

Fonte- Do Autor.

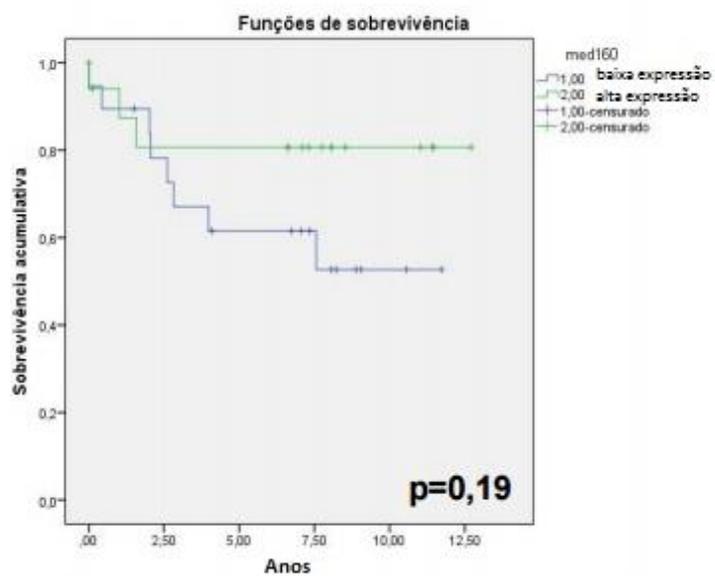


Figura 6 – Análise de sobrevida dos pacientes com LLA associado a análise de expressão gênica dos transcritos da região uc.160

Fonte- Do Autor.

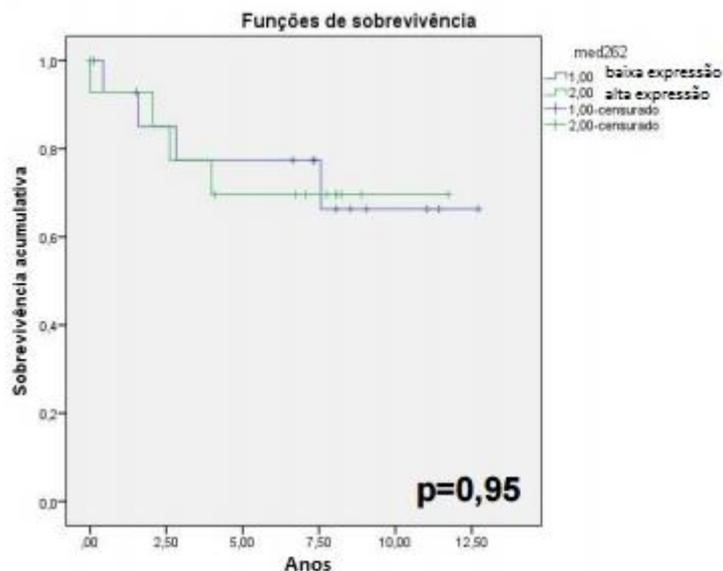


Figura 7 – Análise de sobrevida dos pacientes com LLA associado a análise de expressão gênica dos transcritos da região uc.160

Fonte – Do Autor

5.6 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Inicialmente, buscamos a sequência ultraconservada uc.112 e uc.160, regiões evidenciadas nas associações clínicas, na plataforma blastn com o objetivo de encontrar qualquer homologia ou evidência associada a síntese de produção proteica.

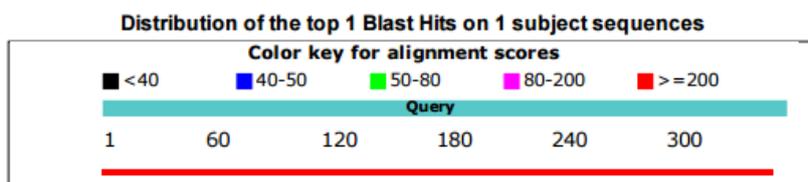
O alinhamento da sequência de nucleotídeos da região uc.112 evidenciou após comparação com o genoma de Homo sapiens, apenas a sequência da região uc.112 com 100% de similaridade (Figura 8), já a análise da região uc.160 também demonstrou 100% de similaridade, porém com duplicidade de informação depositado no banco de dados, porém a homologia apresentada refere-se unicamente as sequências de nucleotídeos da região uc.160 (Figura 9).

BLAST Results

Job title: uc.112+

RID [BVAJUNGW01N](#) (Expires on 03-08 01:28 am)
Query ID lc|Query_38053
Description uc.112+
Molecule type nucleic acid
Query Length 346

Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.6.1+

Graphic SummaryDescriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Homo sapiens chromosome 3 clone RP11-554B20, complete sequence	640	640	100%	0.0	100%	AC099543.2

Figura 8 – Análise de bioinformática da região uc.112 após alinhamento com BLAST. Acesso em 23/03/2017.

Fonte- Do Autor

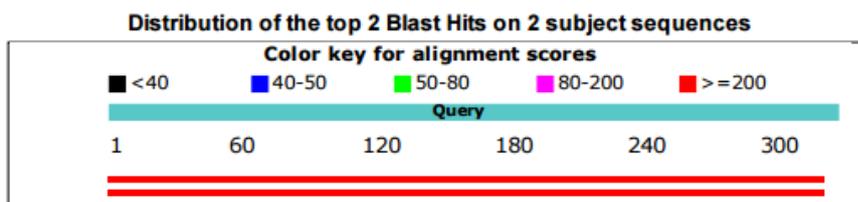
BLAST Results

Job title: uc.160+ (322 letters)

RID [BV97XJ6H01N](#) (Expires on 03-08 01:05 am)

Query ID	lcl Query_153381	Database Name	Human G+T (2 databases)
Description	uc.160+	Description	Program BLASTN 2.6.1+
Molecule type	nucleic acid		
Query Length	322		

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Genomic sequences						
Homo sapiens chromosome 5, alternate assembly CHM1_1.1	595	595	100%	9e-168	100%	NC_018916.2
Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p7 Primary Assembly	595	595	100%	9e-168	100%	NC_000005.10

Figura 9 – Análise de bioinformática da região uc.160 após alinhamento com BLAST.
Acesso em 23/03/2017.

Fonte- Do Autor

Adicionalmente, foi realizada uma análise mais refinada na plataforma UCSC com objetivo de confirmar a alta conservação dessas regiões e ligação a elementos reguladores como fatores de transcrição, metilação de DNA e modificações de histonas.

A análise da região uc.112 (Figura 10) evidenciou alta conservação entre espécies como: macaco *rhesus*, camundongo, cachorro, elefante, galinha, rã e peixes.

Analisando dados obtidos de sequenciamento global de RNA, foi possível verificar que exatamente na região ultra conservada não há ligação de elementos regulatórios, porém, analisando cerca de 350 nucleotídeos a montante (*upstream*) a região, existe uma abertura funcional da cromatina (relacionada a hipersensibilidade da região à DNase I) e ligação de vários fatores de transcrição como: NFIC, ATF2, MAZ, SP1, TBL1XR1, BCLAF1, PAX5, POU2F2, IRF4, RUNX3, EBF1, BATF e BCL11A. Indicando que a expressão dessa região é altamente regulada.

Na região ultra conservada não foi encontrado nenhum polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), porém 4 SNPs foram já descritos poucos nucleotídeos *upstream* da uc.112.

Não foram encontradas evidências da regulação da região por metilação do DNA, porém inúmeras modificações de histonas foram evidenciadas ao longo de toda a extensão analisada (Figura 10).

UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

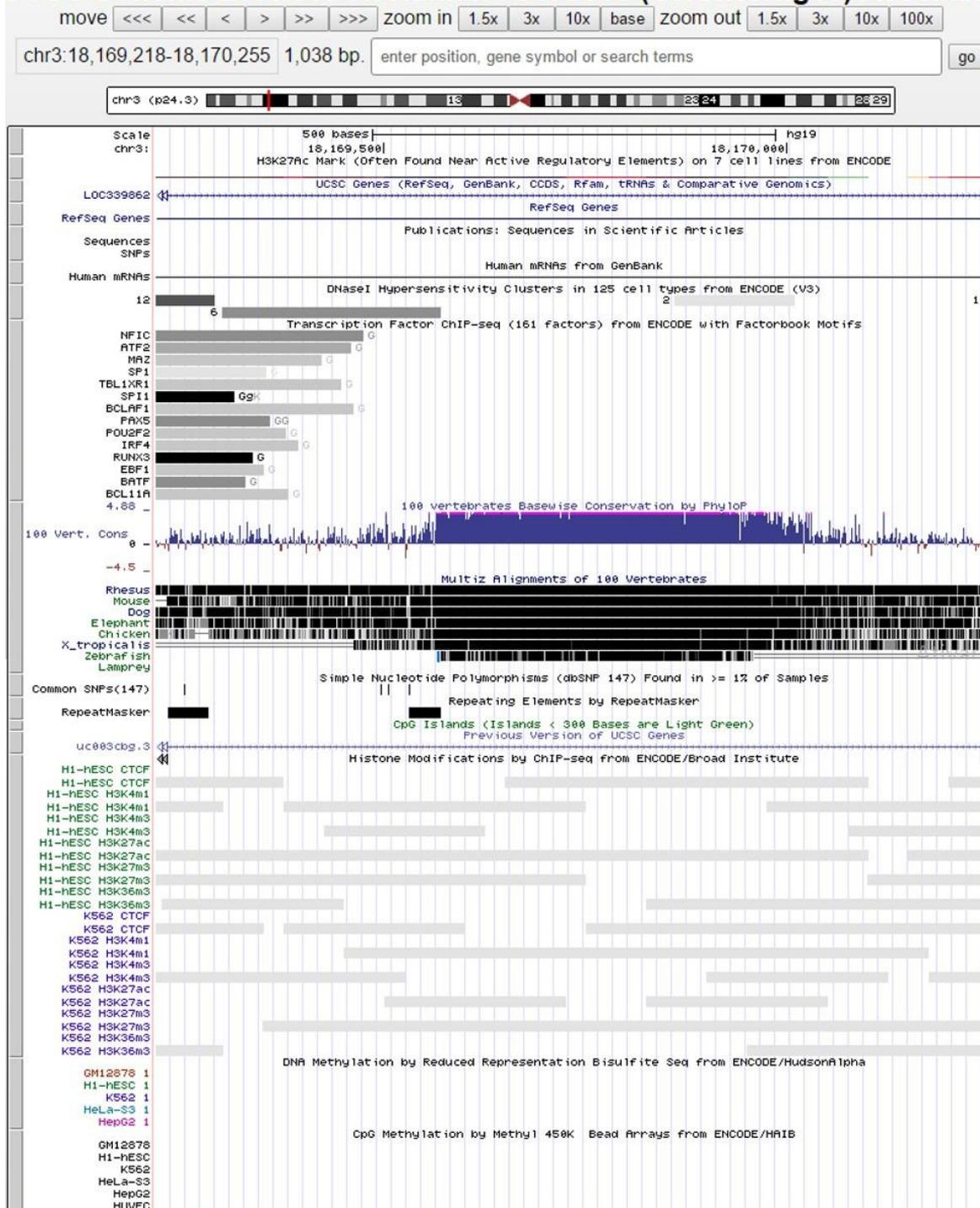


Figura 10 – Análise de bioinformática utilizando a região uc.112 (chr3:18169564-18169909) e um zoom negativo de 3x na plataforma UCSC. Acesso em 23/03/2017.

Fonte- Do Autor

Já a análise da região uc.160 (Figura 11) alta conservação entre espécies como: macaco rhesus, camundongo, cachorro, elefante e menor similaridade em galinha, rã e peixes.

Através na análise dos elementos regulatórios, foi possível verificar que já nos primeiros nucleotídeos da região ultra conservada existe eucromatina (relacionada a hipersensibilidade da região à DNase I) e ligação de vários fatores de transcrição como: EZH2, SUZ12, MAX, CTFC, CHD2, ELF1, RUNX3, YY1, E2F6, RAD21, EBF1, SMC3, USF1. Indicando que a expressão dessa região também é regulada, possivelmente o sítio de início da transcrição fica junto a região de conservação.

Na região ultra conservada não foi encontrado nenhum SNP, sendo encontrado apenas 1 em região *upstream* à conservação.

Essa região também possui a ligação com histonas com várias marcas epigenéticas (de silenciamento e ativação) e, interessantemente, a região *upstream* até cerca do primeiro nucleotídeo da uc.160 é uma ilha CpG e indícios de regulação mediada por metilação do DNA (Figura 11).

6 DISCUSSÃO

Muitas regiões T-UCRs tem sido descritas recentemente associadas com doenças complexas como o câncer (OLIVERI et al., 2016; MARINI et al., 2016). No presente trabalho avaliamos a expressão de algumas T-UCRs (uc.112, uc.122, uc.160 e uc.262) em amostras de crianças e adolescentes com LLA, tipo tumoral ainda não investigado previamente.

A partir destas análises, identificamos que a região uc.112 teve uma expressão aumentada ($P=0,009$) em amostras de MO de crianças e adolescentes com LLA comparando com amostras de MO não tumorais. Adicionalmente, a região uc.112 apresentou expressão aumentada em pacientes diagnosticados com LLA-T ($P=0,03$) e, nos pacientes com hiperdiploidia, foi identificada em baixos níveis.

O aumento da expressão da região uc.112 em pacientes com LLA-T poderia ser associado com um pior prognóstico dos pacientes, porém, a região foi também encontrada hiperexpressa em pacientes com hiperdiploidia, grupo de pacientes considerado de bom prognóstico.

Uma hipótese para explicar o aumento da região uc.112 em pacientes hiperdiploides, seria a presença do cromossomo que carrega essa região entre os cromossomos com cópias extras. Porém, a análise citogenética nos hiperdiploides, mostraram que apenas 1 dos 5 pacientes possuía uma cópia adicional do cromossomo 3, o que não justifica o aumento de expressão da região.

A análise citogenética não exclui a possibilidade de duplicações genômicas submicroscópicas, mas também é possível que outros mecanismos desregulem a expressão da região uc.112 nos pacientes com hiperdiploidia e também nos pacientes com LLA-T.

Os resultados de sobrevida apontaram que cerca de 83% dos pacientes que mais expressaram a região uc.112 tiveram sobrevida livre de eventos em aproximadamente 13 anos comparado com os 60% dos pacientes livre de eventos no grupo dos pacientes que menos expressaram essa região. Embora esse resultado não tenha sido significativo ($P=0,06$), sugere-se uma análise mais aprofundada para definir uma possível associação da região uc.112 com características moleculares que confeririam a esses pacientes um pior

prognóstico.

A região uc.112 está localizada no chr3:18169564-18169909 (hg19) e possui 346pb (BEJERANO et al., 2004). Em 2007, Calin e colaboradores demonstraram que o aumento da expressão da região uc.112 pode estar associada a progressão do tumor colorretal, uma vez que a mesma se mostrou diferencialmente expressa na amostra tumoral em relação a mucosa intestinal normal (CALIN et al., 2007). Embora já tenha sido evidenciado que esta região está mapeada em uma sequência acentuadora conhecida (SCARUFFI, 2010), seu papel biológico permanece desconhecido.

Em nossas análises de bioinformática, foi verificado que a região uc.112 interage com fatores de transcrição importantes tais como: NFIC, ATF2, MAZ, SPI 1, TBL1XR1, BCLAF1, PAX5, POU2F2, IRF4, RUNX3, EBF1, BATF e BCL11A, adicionalmente, a região de ligação desses fatores é hipersensível à DNase I, ou seja, uma região de cromatina menos condensada, e transcricionalmente ativa.

Todos os fatores de transcrição se mostraram ligados em uma região adjacente a porção 5' da região ultraconservada e todos esses fatores foram encontrados em dados de imunoprecipitação/sequenciamento da linhagem GM12878, uma linhagem linfoblastoide humana, sugerindo que, de fato, essa regulação deva ter importância em células da linhagem linfóide, foco do presente estudo.

Deleções de *TBL1XR1* são recorrentes em pacientes com translocação *ETV6-RUNX* com t(12;21) (p13;q22), e essa alteração é identificada em cerca de 25% das crianças diagnosticadas com LLA-B (PARKER, 2008). Pensando que o fator de transcrição *TBLXR1* é um regulador positivo da expressão do transcrito uc.112, é possível que a deleção de *TBL1XR1*, mais comum em pacientes LLA-B, ajude na diminuição da expressão de uc.112 nesse grupo de pacientes em relação aos pacientes LLA-T, que possuem o gene para *TBL1XR1*, podendo produzir o fator de transcrição e regular positivamente a expressão do uc.112.

Sabe-se que *PAX5* é um gene supressor tumoral importante na LLA-B. Esse fator é determinante para o normal desenvolvimento de células B e sua desregulação auxilia no desenvolvimento de malignidades hematológicas (SMEENK et al., 2017). As anormalidades de *PAX5* são altamente específicas

para LLA-B, e podem ser utilizadas como marcadores de diagnóstico (OU et al., 2017), mais especificamente, a interrupção da ligação da PAX5 durante o desenvolvimento precoce das células B está associada ao desenvolvimento da LLA-B (BRAZÃO et al., 2016). Portanto, a diminuição do PAX5 se torna indispensável para a diferenciação de LLA-B, e por não estar relacionado a ação de PAX5 na LLA-T é possível que o aumento da uc.112 esteja, pelo menos em parte, relacionado com o aumento de PAX5.

O fator de transcrição IRF4, também é expresso logo no início do desenvolvimento de células B e seu bloqueio já foi evidenciado como relacionado com a LLA-B (PANG et al., 2016). Portanto, é possível que há uma diminuição de IRF4 nos pacientes B, em relação ao LLA-T, que auxiliaria a explicar a diminuição de uc.112.

Foi investigado os efeitos de metilação no promotor do gene RUNX3, das leucemias agudas em geral, e os pacientes que não apresentavam metilação para RUNX3, apresentavam um menor valor percentual de blastos imaturos na MO, como também uma maior taxa da remissão durante a primeira indução da quimioterapia em contraparte aos pacientes positivos para metilação de RUNX3, e provavelmente a metilação do gene RUNX3 pode desempenhar um papel significativo para progressão das leucemias agudas, adquirindo uma significância e valia clínica referindo-se na previsão do prognóstico da LLA (LIN; FAN; LIU, 2008), além disso esse mesmo fator de transcrição também foi evidenciado após análises de bioinformática em análises da região uc.160.

O fator de transcrição EBF1 é responsável pelo desenvolvimento e manutenção de células linfoides do tipo B, e qualquer alteração genética que proporciona a perda da função do gene interfere diretamente na função celular, sendo associada a progressão da LLA-B (GEORGOPOULOS, 2015; MESURAKA et al., 2015). Portanto, a perda de EBF1 em pacientes LLA-B, poderia auxiliar a diminuição da região uc.112 nos pacientes analisados.

Outro estudo revelou que BCL11A está envolvido em uma relação inversa significativa com a expressão de miRNAs localizado no locus cromossômico 14q32 pois este gene codifica fatores de transcrição importantes em células linfoides do tipo B, logo, alterações pertinentes no envolvimento na progressão da leucemia corroboram na malignidade de células linfoides do tipo

B, e podem ainda ser utilizados como marcadores de diagnóstico e alvo terapêutico para LLA (AGUELI et al., 2010).

Já a região uc.160 foi inicialmente identificada como uma das nove UCRs (uc.112 uc.122, uc.160, uc.192, uc.231, uc.262, uc.289, uc.316, uc.352) mais informativas na análise do perfil de expressão dos pacientes com leucemia LLC, e também correlacionado com a expressão dos miRNAs: miR-24, miR-155, miR-223, miR146a, sendo validada a regulação direta com o miR-24 e com o miR-155, ou seja, comprovando que uc.160 é um alvo desses miRNAs (DUYU et al., 2014).

Em nossos resultados, essa região também parece ser interessante em LLA, pois essa região foi encontrada aumentada em pacientes com LLA-T em relação aos pacientes com o diagnóstico de LLA-B. Outro estudo reforça a importância da região uc.160 em células hematopoiéticas, pois sua expressão está aumentada em granulócitos e diminuída em monócitos, identificando assinaturas distintas em linhagens particulares, sendo uma possível função dessa região estar envolvida no controle da hematopoiese, porém essa hipótese ainda não foi testada experimentalmente (GARZON et al., 2008).

Adicionalmente, a regulação da expressão da região uc.160 foi descrita como dependente de metilação, por exemplo, foi descrito que linhagens celulares derivadas de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231, CAMA-1), de pulmão (H552, H441, H358, EBC1), linfoma (Ramos, Raji, Namalwa) e células de leucemia, incluindo linhagens de LLA-B (ReH) e LLA-T (Jurkat) apresentam hipermetilação em ilha CpG na região 5' próxima a sequência uc.160 e que o tratamento de agente demetilante aumenta a expressão da mesma e que entre as várias linhagens analisadas, incluiu 7 linhagens de LLA (3 LLA-T e 4 LLA-B) podendo verificar que a região apresentava diferença do perfil de metilação, encontrando algumas linhagens tanto B e T com e sem a metilação (LUJAMBIO et al., 2010).

Esse mecanismo de regulação da expressão gênica também pode ser confirmado por nossos resultados de bioinformática, que demonstraram sítio de metilação especificamente na região ultraconservada em linhagens HEPG2, HELA, K562 e na linhagem de origem linfoblástico GM12878 e uma ilha CpG grande poucos nucleotídeos *upstream* a uc.160.

Embora ainda não tenha sido testada essa hipótese, é possível também

que esse mecanismo epigenético ajude a regular o perfil e expressão diferencial vista nos pacientes com LLA, em relação ao subtipo imunológico.

Adicionalmente, após análise de bioinformática, foi encontrado 9 fatores de transcrições proximais a região uc.160 no genoma humano, sendo estes (EZH2, SUZ12, MAX, CTCF, CHD2, ELF1, RUNX3, XY1, E2F6, RAD21, EBF1, SMC3, USF1).

Com relação ao envolvimento da região uc.122 em processos tumorais, foi identificado uma expressão aumentada em LLC (CALIN et al., 2007) e essa região também foi uma das 28 T-UCRs identificadas em regiões de DNA desbalanceadas em pacientes com neuroblastoma e fortemente associada com a presença de alterações no DNA (SCARUFFI et al., 2009). Mais especificamente, a região genômica contendo uc.122 foi encontrada deletada em um paciente com pior prognóstico e com amplificação em dois pacientes classificados entre os de maior sobrevida. Um estudo pioneiro sobre desordens do desenvolvimento neurológico associado a anomalias congênitas, descreveu um paciente com perda genômica na região na qual a uc.122 está mapeada (MARTÍNEZ et al., 2010).

E dentre as associações clínicas analisadas neste presente estudos, a região uc.122 não foi evidenciada entre os parâmetros clínicos avaliados.

Já a região uc.262 exibiu uma baixa expressão de seus transcritos em amostras de MO tumoral, em relação às amostras de MO não tumoral, porém esta mesma região nas outras análises em associação com parâmetros clínicos da leucemia, não exibiu associação.

A região uc.262, possuiu uma importância nas análises em LLC (CALIN et al., 2007) sabe-se também que esta região encontra-se mapeada em região com conhecida atividade acentuadora (SCARUFFI et al., 2011), seu envolvimento com processos tumorais é desconhecido, não tendo sido evidenciado em mais trabalhos na literatura.

A região uc.252 que no estudo piloto apresentou expressão em 28% dos pacientes e a região uc.316, com 44% dos pacientes, não foram analisados em relação aos parâmetros clínicos, uma vez que aparentemente tem uma baixa expressão global em amostras de pacientes com LLA.

A região uc.252 foi encontrada com expressão aumentada em amostras tumorais de carcinoma hepatocelular (CALIN et al., 2007). Outro estudo que

buscou associação de SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) em câncer de mama, identificou que a região uc.252 não apresentou relação com risco do câncer em questão (YANG et al., 2008). A região uc.252 foi analisada em um estudo que buscou evidenciar a hipermetilação do DNA associado a interações de miRNAs em câncer gástrico e de próstata, também não evidenciou nível de significância de expressão desta região aos tumores em questão (GOTO et al., 2015).

A região uc.252 também foi analisada em trabalho sobre a patogênese da dor neuropática, não sendo identificado associação com a expressão (JIANG et al., 2016).

Com relação a região uc.316, essa já foi evidenciado com expressão diminuída em pacientes com LLC (CALIN et al., 2007). Mas nenhum outro dado foi encontrado na literatura para melhor evidenciar e explicar possíveis associações desta região.

Sabe-se que os T-UCRs são alterados a nível transcricional em diversos tipos de tumores, e que os perfis de expressão podem ser utilizados para diferenciar tecidos tumorais como dos tipos hepatocarcinoma, colorretal e leucemia linfóide crônica, pois a expressão dos mesmos possui perfis únicos de expressão (CALIN et al., 2007).

Diferenças de expressão de T-UCRs na LLA foram demonstrados pela primeira vez pelo presente trabalho, incluindo a possibilidade de diferenciar subtipos dentro de um mesmo tipo tumoral, abordagem ainda pouco explorada na literatura.

O presente trabalho contribui para sugestão de um possível envolvimento da região uc.112 na determinação do imunofenótipo e presença de hiperdiploidia e a uc.160 com a determinação de imunofenótipo, e essas diferenças poderiam ainda justificar as diferenças clínicas entre os subtipos, porém, novas análises se fazem necessárias para confirmar e estender esses achados.

7 CONCLUSÕES

As conclusões evidenciadas foram:

- a) Foi verificado que a região uc.112 está hiperexpressa e a região uc.262 está hipoexpressa em amostras de medula óssea de crianças e adolescentes com LLA, em relação a medulas óssea de crianças sem doenças hematológicas;
- b) As regiões uc.112 e uc.160 foram encontradas com uma expressão aumentada em amostras de pacientes LLA-T com relação aos pacientes com LLA-B;
- c) A região uc.112 obteve uma baixa expressão em pacientes com hiperdiploidia;
- d) Não há evidências que as regiões T-UCRs uc.112, uc.122, uc.160 e uc.262 estejam associadas com sobrevida em crianças e adolescentes com LLA;
- e) A região uc.112 pode sofrer influências de fatores de transcrição :NFIC, ATF2, MAZ, SPI 1, TBL1XR1, BCLAF1, PAX5, POU2F2, IRF4, RUNX3, EBF1, BATF e BCL11A e modificações de histonas,
- f) E a região uc.160 pode também sofrer influências de fatores de transcrição: EZH2, SUZ12, MAX, CTFC, CHD2, ELF1, RUNX3, XY1, E2F6, RAD21, EBF1, SMC3, USF1, modificações de histonas e metilação de DNA.

REFERÊNCIAS

ADAMAKI, M. et al. Implication of IRF4 aberrant gene expression in the acute leukemias of childhood. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 8, p. e72326, 2013.

AGUELI, C. et al. 14q32/miRNA Clusters loss of heterozygosity in acute lymphoblastic leukemia is associated with up-regulation of BCL11a. **American journal of hematology**, Oxford, v. 85, n. 8, p. 575-578, 2010.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**. London, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.

ARICÒ, M. et al. Improved outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia defined by prednisone-poor response treated with double Berlin-Frankfurt-Muenster protocol II. **Blood**, Washington, v. 100, n. 2, p. 420-426, 2002.

ARICÒ, M. et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, U.K, v. 342, n. 14, p. 998-1006, 2000.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **cell**, United States, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BEJERANO, G. et al. Ultraconserved elements in the human genome. **Science**, Cambridge, v. 304, n. 5675, p. 1321-1325, 2004.

BELMONTE, M. et al. Targeting leukemia stem cells: which pathways drive self-renewal activity in T-cell acute lymphoblastic leukemia?. **Current Oncology**, New York, v. 23, n. 1, p. 34, 2016.

BHOJWANI, D.; Y., Jun J.; PUI, Ching-Hon. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric clinics of North America**, Toronto, v. 62, n. 1, p. 47-60, 2015.

BRACONI, C. et al. Expression and functional role of a transcribed noncoding RNA with an ultraconserved element in hepatocellular carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Texas, v. 108, n. 2, p. 786-791, 2011.

CALIN, G. A. et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. **Cancer cell**, Cambridge, v. 12, n. 3, p. 215-229, 2007.

CALIN, G. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proceedings of the National**

academy of Sciences of the United States of America, New York, v. 101, n. 9, p. 2999-3004, 2004.

CAWLEY, S. et al. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. **Cell**, Washington, v. 116, n. 4, p. 499-509, 2004.

CHALEI, V. et al. The long non-coding RNA Dali is an epigenetic regulator of neural differentiation. **Elife**, Cambridge, v. 3, p. e04530, 2014.

CHIBA, T. et al. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. **Gastroenterology**, Las Vegas, v. 133, n. 3, p. 937-950, 2007.

DE KEERSMAECKER, K. et al. The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. **Nature medicine**, U.K, v. 16, n. 11, p. 1321-1327, 2010.

de Oliveira JC, Brassesco MS, Scrideli CA, Tone LG, Narendran A. MicroRNA expression and activity in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Pediatr Blood Cancer**, Hoboken, 2012 Apr 10.

DUURSMA, A. M. et al. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. **Rna**, Cambridge, v. 14, n. 5, p. 872-877, 2008.

DUYU, M. et al. Prospective evaluation of whole genome microRNA expression profiling in childhood acute lymphoblastic leukemia. **BioMed research international**, Cambridge, v. 2014, 2014.

EMMRICH, S. et al. LincRNAs MONC and MIR100HG act as oncogenes in acute megakaryoblastic leukemia. **Molecular cancer**, New York, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

FARIAS, M.; DE CASTRO, Simone Martins. **Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas**. Rio de Janeiro, 2004.

FASSAN, M. et al. Transcribed ultraconserved noncoding RNAs (T-UCR) are involved in Barrett's esophagus carcinogenesis. **carcinogenesis**, Texas, v. 18, p. 22, 2014.

FLETCHER, J. A. et al. Extremely poor prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia with translocation (9; 22): updated experience. **Leukemia & lymphoma**, v. 8, n. 1-2, p. 75-79, 1992.

FORESTER, C. M. et al. Tumefactive intracranial presentation of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric radiology**, Novi Sad, v. 39, n. 11, p. 1230-1233, 2009.

GARZON, R. et al. Ultraconserved Genomic Regions (UCRs) Expression in Hematopoiesis. **Blood**, Cambridge, v. 112, n. 11, p. 2461-2461, 2008.

GEORGOPOULOS, K.. Lymphoid Neoplasia: Ebf1 in DNA repair and leukemogenesis. **Blood**, Cambridge, v. 125, n. 26, p. 3969, 2015.

GOLDBERG, S. L. et al. Myelodysplastic subclones in chronic myeloid leukemia: implications for imatinib mesylate therapy. **Blood**, Cambridge, v. 101, n. 2, p. 781-781, 2003.

GOTO, K. et al. The transcribed-ultraconserved regions in prostate and gastric cancer: DNA hypermethylation and microRNA-associated regulation. **Oncogene**, Shanghai, 2015.

GREAVES, M.. Childhood leukaemia. **British Medical Journal**, Tainan, v. 324, n. 7332, p. 283, 2002.

HAJJARI, M.; KHOSHNEVISAN, A.; SHIN, Y.. Long non-coding RNAs in hematologic malignancies: road to translational research. **Frontiers in genetics**, Stony Brook, v. 4, p. 250, 2013.

HAN, Y. et al. Prognostic role of C-reactive protein in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Int J Biol Markers**, San Diego, v. 26, n. 4, p. 209-215, 2011.

HARRISON, C. J. et al. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. **British journal of haematology**, v. 129, n. 4, p. 520-530, 2005.

HARRISON, C. J.; FORONI, L.. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Reviews in clinical and experimental hematology**, Stony Brook, v. 6, n. 2, p. 91-113, 2002.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, Mainz, v. 5, n. 7, p. 522-531, 2004.

HILLER, Michael; SCHAAR, Bruce T.; BEJERANO, Gill. Hundreds of conserved non-coding genomic regions are independently lost in mammals. **Nucleic acids research**, Headington, v. 40, n. 22, p. 11463-11476, 2012.

HUANG, P. Y. et al. Surface profiles for subclassification of chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, Stony Brook, v. 53, n. 6, p. 1046-1056, 2012.

HUDSON, M. M. et al. Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer. **Jama**, Brisbane, v. 309, n. 22, p. 2371-2381, 2013.

HUDSON, R. S. et al. Transcription signatures encoded by ultraconserved genomic regions in human prostate cancer. **Molecular cancer**, Hongo Bunkyo, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

HUNG, C. et al. A long noncoding RNA connects c-Myc to tumor metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Illinois, v. 111, n. 52, p. 18697-18702, 2014.

HUNGER, S. P. et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric blood & cancer**, Valhalla, v. 60, n. 6, p. 957-963, 2013.

IRONS, R. D.; STILLMAN, Wayne S. The process of leukemogenesis. **Environmental health perspectives**, Leiden, v. 104, n. Suppl 6, p. 1239, 1996.

JIANG, B. et al. Altered T-UCRs expression profile in the spinal cord of mice with neuropathic pain. **Translational perioperative and pain medicine**, Loma Linda, v. 1, n. 3, p. 1, 2016.

JONES, C. L. et al. Loss of TBL1XR1 disrupts glucocorticoid receptor recruitment to chromatin and results in glucocorticoid resistance in a B lymphoblastic leukemia model. **Journal of Biological Chemistry**, College Station, v. 289, n. 30, p. 20502-20515, 2014.

KARATHANASIS, E. et al. Tumor vascular permeability to a nanoprobe correlates to tumor-specific expression levels of angiogenic markers. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5843, 2009.

KATZMAN, S. et al. Human genome ultraconserved elements are ultraselected. **Science**, New York, v. 317, n. 5840, p. 915-915, 2007.

KEBRIAEI, Partow; LARSON, Richard A. Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Current opinion in hematology**, Umeå, v. 10, n. 4, p. 284-289, 2003.

KOGURE, T. et al. Extracellular Vesicle–Mediated Transfer of a Novel Long Noncoding RNA TUC339 A Mechanism of Intercellular Signaling in Human Hepatocellular Cancer. **Genes & cancer**, Eiheiji-Chou, p. 1947601913499020, 2013.

KULIS, M. et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. **Nature genetics**, Worcester, v. 44, n. 11, p. 1236-1242, 2012.

LE JEUNE, C. et al. Initial absolute lymphocyte count as a prognostic factor for outcome in acute myeloid leukemia. **Leukemia & lymphoma**, Hong Kong, v. 55, n. 4, p. 855-862, 2014.

LE JEUNE, C.; THOMAS, X. Potential for bispecific T-cell engagers: role of blinatumomab in acute lymphoblastic leukemia. **Drug design, development and therapy**, Edinburgh, v. 10, p. 757, 2016.

LIN, D. J.; FAN, R. F.; LIU, X. F. Significance of DNA methylation status of runx3 gene promoter region in acute leukemia. **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi**, Worcester, v. 16, n. 2, p. 263-266, 2008.

LIN, M. et al. Identification of polymorphisms in ultraconserved elements associated with clinical outcomes in locally advanced colorectal adenocarcinoma. **Cancer**, Venlo, v. 118, n. 24, p. 6188-6198, 2012.

LIZ, J. et al. Regulation of pri-miRNA processing by a long noncoding RNA transcribed from an ultraconserved region. **Molecular cell**, Boston, v. 55, n. 1, p. 138-147, 2014.

LIZ, J.; ESTELLER, Manel. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, Brisbane v. 1859, n. 1, p. 169-176, 2016.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **nature**, London, v. 435, n. 7043, p. 834-838, 2005.

LUJAMBIO, A. et al. CpG island hypermethylation-associated silencing of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in human cancer. **Oncogene**, Shenyang Dusseldorf ,v. 29, n. 48, p. 6390-6401, 2010.

MA, X. et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. **Nature communications**, Morgantown New Haven v. 6, 2015.

MARCOVITZ, A.; JIA, R.; BEJERANO, G. "Reverse Genomics" Predicts Function of Human Conserved Noncoding Elements. **Molecular biology and evolution**, San Francisco v. 33, n. 5, p. 1358-1369, 2016.

MARINI, A. et al. Ultraconserved long non-coding RNA uc. 63 in breast cancer. **Oncotarget**, Baltimore v. 5, 2016.

MARTÍNEZ, F. et al. Enrichment of ultraconserved elements among genomic imbalances causing mental delay and congenital anomalies. **BMC medical genomics**, Aurora v. 3, n. 1, p. 1, 2010.

MATTICK, J. S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **Bioessays**, Brisbane v. 25, n. 10, p. 930-939, 2003.

MATTICK, J. S. The central role of RNA in human development and cognition. **FEBS letters**, Denver v. 585, n. 11, p. 1600-1616, 2011.

MCCOLE, R. B. et al. Abnormal Dosage of Ultraconserved Elements Is Highly Disfavored in Healthy Cells but Not Cancer Cells. **PLoS Genet**, San Francisco v. 10, n. 10, p. e1004646, 2014.

MCLEAN, C.; BEJERANO, G. Dispensability of mammalian DNA. **Genome research**, Montreal v. 18, n. 11, p. 1743-1751, 2008.

MENDELL, M. J.; HEATH, G. A. Do indoor pollutants and thermal conditions in schools influence student performance? **A critical review of the literature**. *Indoor air*, v. 15, n. 1, p. 27-52, 2005.

MESTDAGH, P. et al. An integrative genomics screen uncovers ncRNA T-UCR functions in neuroblastoma tumours. **Oncogene**, Baltimore v. 29, n. 24, p. 3583-3592, 2010.

MESURACA, M. et al. ZNF423 and ZNF521: EBF1 antagonists of potential relevance in B-lymphoid malignancies. **BioMed research international**, Osaka-Sayama v. 2015, 2015.

MICHALAK, P. RNA world—the dark matter of evolutionary genomics. **Journal of evolutionary biology**, Montreal v. 19, n. 6, p. 1768-1774, 2006.

MOORMAN, A. V. et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Blood**, San Francisco p. blood-2014-03-562918, 2014.

MORENO, C. et al. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance. **Blood**, San Francisco, v. 116, n. 23, p. 4771-4776, 2010.

MORLANDO, M.; BALLARINO, M.; FATICA, Alessandro. Long non-coding RNAs: new players in hematopoiesis and leukemia. **Frontiers in medicine**, Lucknow, v. 2, p. 23, 2015.

NAN, A. et al. A transcribed ultraconserved noncoding RNA, Uc. 173, is a key molecule for the inhibition of lead-induced neuronal apoptosis. **Oncotarget**, Tampa v. 7, n. 1, p. 112, 2016.

NI, J. Z. et al. Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. **Genes & development**, New Haven, v. 21, n. 6, p. 708-718, 2007.

OLIVIERI, M. et al. Long non-coding RNA containing ultraconserved genomic region 8 promotes bladder cancer tumorigenesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 20636, 2016.

ONCIU, M.. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, Salt Lake City, v. 23, n. 4, p. 655-674, 2009.

ORGANISTA-NAVA, J. et al. High miR-24 expression is associated with risk of relapse and poor survival in acute leukemia. **Oncology reports**, Loma Linda, v. 33, n. 4, p. 1639-1649, 2015.

OU, Z. et al. The Genomic Landscape of PAX5, IKZF1, and CDKN2A/B Alterations in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 150, n. 3-4, p. 242-252, 2017.

PANG, S. Heng M. et al. PU. 1 cooperates with IRF4 and IRF8 to suppress pre-B-cell leukemia. **Leukemia**, Baltimore, 2016.

PARKER, H. et al. The complex genomic profile of ETV6-RUNX1 positive acute lymphoblastic leukemia highlights a recurrent deletion of TBL1XR1. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 47, n. 12, p. 1118-1125, 2008.

PEDROSA, F.; LINS, Mecneide. Acute lymphoblastic leukemia: a curable disease. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n. 1, p. 63-68, 2002.

PENG, J.; SHEN, Jun; RAN, Zhi Hua. Transcribed ultraconserved region in human cancers. **RNA biology**, v. 10, n. 12, p. 1771-1777, 2013.

PUI, C.. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of the Formosan Medical Association**, Brisbane, v. 109, n. 11, p. 777-787, 2010.

PUI, C.; EVANS, William E. Acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, Wenzhou, v. 339, n. 9, p. 605-615, 1998.

PUI, C.; EVANS, William E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, Salt Lake City, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.

PUI, C.; JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. Nature reviews **Drug discovery**, Brisbane, v. 6, n. 2, p. 149-165, 2007.

PUI, J. C. et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. **Immunity**, Newcastle v. 11, n. 3, p. 299-308, 1999.

QIAN, X. et al. Noncoding Transcribed Ultraconserved Region (T-UCR) uc. 261 Participates in Intestinal Mucosa Barrier Damage in Crohn's Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, Wenzhou, v. 22, n. 12, p. 2840-2852, 2016.

QUAGLIATA, L.; TERRACCIANO, L. M. Liver diseases and long non-coding RNAs: New insight and perspective. **Frontiers in medicine**, Macao, v. 1, 2014.

REIS, E. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Perspectives of long non-coding RNAs in cancer diagnostics. **Genomic "dark matter": implications for understanding human disease mechanisms, diagnostics, and cures**, Los Angeles, v. 8, p. 62, 2012.

REITER, A. et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. **Blood**, v. 84, n. 9, p. 3122-3133, 1994.

ROBINSON, B. W. et al. Abundant anti-apoptotic BCL-2 is a molecular target in leukaemias with t (4; 11) translocation. **British journal of haematology**, Macao, v. 141, n. 6, p. 827-839, 2008.

RYU, T.; SERIDI, L.; RAVASI, T. The evolution of ultraconserved elements with different phylogenetic origins. **BMC evolutionary biology**, Wenzhou, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

SCARUFFI, P. et al. Transcribed-ultra conserved region expression is associated with outcome in high-risk neuroblastoma. **BMC cancer**, Los Angeles, v. 9, n. 1, p. 441, 2009.

SCARUFFI, P. The transcribed-ultraconserved regions: a novel class of long noncoding RNAs involved in cancer susceptibility. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 340-352, 2011.

SCHAFER, E. S.; HUNGER, S. P. Optimal therapy for acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. **Nature Reviews Clinical Oncology**, New Haven, v. 8, n. 7, p. 417-424, 2011.

SCHÄFER, V. et al. EZH2 mutations and promoter hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Macao Journal of cancer research and clinical oncology**, New Haven, v. 142, n. 7, p. 1641-1650, 2016.

SCHOTTE, D. et al. MicroRNAs characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, Salt Lake City, p. haematol. 2010.026138, 2011.

SCRIDELI, C. A. et al. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. **haematologica**, Wenzhou, v. 94, n. 6, p. 781-789, 2009.

SHEN, H. et al. Genetic variants in ultraconserved elements and risk of breast cancer in Chinese population. **Breast cancer research and treatment**, Salt Lake City, v. 128, n. 3, p. 855-861, 2011.

SILVA, A.; BULLOCK, M.; CALIN, G. The clinical relevance of long non-coding RNAs in cancer. **Cancers**, Haidari, v. 7, n. 4, p. 2169-2182, 2015.

SMEENK, Leonie et al. Molecular role of the PAX5-ETV6 oncoprotein in promoting B-cell acute lymphoblastic leukemia. **The EMBO Journal**, Los Angeles, v. 36, n. 6, p. 718-735, 2017.

SMITH, M. et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 18-24, 1996.

SZCZEPANEK, J. et al. Relapse of acute lymphoblastic leukemia in children in the context of microarray analyses. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, Wenzhou, v. 59, n. 1, p. 61-68, 2011.

TACCIOLI, C. et al. UCbase & miRfunc: a database of ultraconserved sequences and microRNA function. **Nucleic acids research**, Los Angeles, v. 37, n. suppl 1, p. D41-D48, 2009.

TAKAYAMA, K. et al. Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. **The EMBO journal**, Los Angeles, v. 32, n. 12, p. 1665-1680, 2013.

VAN DONGEN, J. J. M. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease Report of the BIOMED-I Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia**, Haidari, v. 13, p. 1901-1928, 1999.

VITURAWONG, T. et al. A DNA-centric protein interaction map of ultraconserved elements reveals contribution of transcription factor binding hubs to conservation. **Cell reports**, Salt Lake City, v. 5, n. 2, p. 531-545, 2013.

VOLINIA, S. et al. Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. **Genome research**, Haidari, v. 20, n. 5, p. 589-599, 2010.

VROOMAN, L. M.; SILVERMAN, L. B. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. **Current opinion in pediatrics**, Los Angeles, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2009.

WANG, J. et al. Large number of ultraconserved elements were already present in the jawed vertebrate ancestor. **Molecular biology and evolution**, Salt Lake City, v. 26, n. 3, p. 487-490, 2009.

WIEMELS, J. L. et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. **The Lancet**, v. 354, n. 9189, p. 1499-1503, 1999.

WU, S. C.; KALLIN, E. M.; ZHANG, Y. Role of H3K27 methylation in the regulation of lncRNA expression. **Cell research**, Lyon, v. 20, n. 10, p. 1109-1116, 2010.

XUE, K. et al. PAX5 promotes pre-B cell proliferation by regulating the expression of pre-B cell receptor and its downstream signaling. **Molecular immunology**, Wenzhou, v. 73, p. 1-9, 2016.

YANG, L. et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. **Nature**, London, v. 500, n. 7464, p. 598-602, 2013.

YANG, Rongxi et al. SNPs in ultraconserved elements and familial breast cancer risk. **Carcinogenesis**, Salt Lake City, v. 29, n. 2, p. 351-355, 2008.

ZHANG, J. et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, Los Angeles, v. 481, n. 7380, p. 157-163, 2012.