

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE MIRNAS COM A SUSCETIBILIDADE A MUCOSITE ORAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Camile de Barros LOPES

LOPES, Camile de Barros. **Associação de polimorfismo de mirnas com a suscetibilidade a mucosite oral em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda**. Projeto de investigação científica, do Curso de Odontologia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2020.

Investigar a associação de polimorfismos genéticos nos microRNAs miR-200b (rs9660710), miR-200c (rs12904) e pre-miR-938 (rs2505901) e a ocorrência de mucosite oral (MO) em pacientes pediátricos portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), em tratamento com MTX, foi o objetivo deste estudo. A LLA é uma das neoplasias infantis mais comuns e representa 75% dos casos de leucemias em crianças. A região Norte do Brasil apresenta a maior taxa de incidência desse tipo de neoplasia, acima de 39%. Embora nos últimos anos as taxas de sobrevivência dos pacientes com LLA tenham aumentando devido ao progresso terapêutico, ainda se tem uma baixa qualidade de vida dos pacientes infantis em detrimento das

comorbidades associadas ao tratamento oncológico. A MO é a complicação frequente observada da terapia contra a LLA. O desenvolvimento de MO tem um impacto direto na qualidade de vida do paciente, pois pode levar à dor, comprometimento da ingestão oral, perda de peso, aumento da incidência de infecções secundárias ou sistêmicas e ao tratamento oncológico insatisfatório. A modulação no risco de desenvolver MO pode ser influenciada por mecanismos regulatórios que envolvem a proliferação celular e/ou apoptose, dois processos importantes para a renovação da mucosa oral. Neste contexto, estudos que investiguem alterações na expressão gênica que participam da via apoptótica e do ciclo celular são importantes, pois podem prever a suscetibilidade em desenvolver a MO, proporcionando dados clínicos capazes de justificar a elaboração de protocolos específicos, aplicáveis ao tratamento oncológico da LLA, que melhorariam a qualidade de vida dos pacientes, pela identificação precoce dos pacientes que predispõe à MO. Dessa forma, investigar polimorfismos de microRNAs que regulam os genes apoptóticos BCL2 e do ciclo celular, CDKN1A é importante porque esses polimorfismos mostram-se como

marcadores biológicos importantes para a MO em pacientes que estão em tratamento oncológico da LLA com MTX. A LLA abrange um grupo de neoplasias linfoides que, morfológica e imunofenotipicamente, se assemelham à linhagem B ou à linhagem T das células precursoras. Nesse contexto, esta transformação maligna se manifesta a partir de múltiplas mutações genéticas que perturbam o processo celular, proporcionando uma vantagem proliferativa do clone leucêmico sobre as células hematopoiético normal (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015). As manifestações clínicas dessa patologia sucedem, como palidez, sangramentos gengivais, fadiga, infecções causadas por neutropenia, dor nas extremidades inferiores, linfadenopatia e esplenomegalia (O'BRIEN; SEIF; HUNGER, 2018). O tratamento da LLA é composto por três fases diferenciadas: i) indução; ii) consolidação e iii) manutenção. Assim, os pacientes são estratificados em grupos de risco e incluídos em protocolos com esquemas quimioterápicos. Dentre esses, tem-se o metotrexato (MTX), uma droga análoga ao folato é utilizado na fase de consolidação e terapia de manutenção para crianças com LLA (LOPEZ-LOPEZ *et al.*, 2014). O MTX tem atividade antiproliferativa em células malignas, visto que semelhante

aos folatos naturais, o MTX é convertido em MTX poliglutamato (MTXPG) pela enzima folilpoliglicetamil transferase, o qual acarreta na interrupção da síntese da timidina e, conseqüentemente, a formação do DNA, parando a replicação de células cancerosas. Apesar dos benefícios da quimioterapia com o MTX, certos pacientes não estão isentos de efeitos citotóxicos, como danos em tecidos normais, principalmente aqueles que estão em constante renovação celular, como a mucosa oral (SCHMIEGELOW *et al.*, 2014). A mucosa oral é a estrutura que reveste a superfície interna da cavidade oral. Sua estrutura é constituída de epitélio e lâmina própria, sendo o epitélio oral estratificado pavimentoso. As funções da mucosa oral são proteção contra agressões mecânicas e microbiológicas, secreção, sensorial e recobrimento. Sendo assim, por sua função de forramento, o epitélio oral apresenta rápida proliferação e constantemente renovação (QIN; STEEL; FAZEL, 2017). Assim, uma das toxidades do MTX é a mucosite oral (MO), a qual é descrita como uma inflamação na mucosa oral que causa dor, ulcerações, com ou sem pseudomembrana, sangramentos e infecções locais ou sistêmicas (RIBEIRO *et al.*, 2017). Muitos estudos são centralizados em variações de genes que

codificam proteínas, no entanto é importante destacar que variações em regiões não codificantes de proteínas como os microRNAs (miRNAs) podem ser relevantes para uma resposta adequada ao MTX e, conseqüentemente, a prevenção da toxicidade (MISHRA *et al.*, 2008). Os miRNAs são pequenos ácidos ribonucleicos, aproximadamente, de 21 a 23 nucleotídeos que regulam a expressão do gene pós-transcricionalmente por meio do pareamento com seu gene-alvo e este processo ocorre pela degradação do miRNA ou por repressão da tradução. Sendo assim, são essenciais para a homeostasia do organismo. No entanto, quando se tem alterações nessas moléculas, como a presença de um polimorfismo, a expressão gênica é modificada (ROMAINE *et al.*, 2015). Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) é uma variação da sequência de nucleotídeos em um alelo de um gene, que deve ter uma frequência relativamente elevada na população (>1%). A presença de um SNP em um sítio de ligação ou no gene que codifica um miRNA pode afetar a sua expressão, resultando na alteração da regulação de um gene alvo. Os miRNAs apresentam papéis importantes na sustentabilidade regulatória de funções celulares, logo a alteração em seus níveis de expressão desempenha

funções ativas na desregulação do desenvolvimento (SUN *et al.*, 2009; VAROL *et al.*, 2011). O gene MIR938 é responsável pelas vias regulatórias dos genes relacionados à sobrevivência celular e apoptose. Além disso, variantes do tipo SNP presentes neste gene foram associadas a modificações em sua biogênese e estabilidade, como o presente no pre-mir-938 (rs2505901). Adicionalmente, um dos genes- alvos para este miR é o CDKN1A, o qual codifica uma proteína encarregada pela interrupção da multiplicação celular em resposta aos danos no DNA. Além disso, é essencial para a regulação celular relacionada à transição G1 / S e posterior proliferação celular via quinase dependente da ciclina (LI *et al.*, 2017; TORRUELLA-LORAN *et al.*, 2019). Os miRNAs 200b e 200c estão envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica de diversos genes, inclusive do gene BCL2 (TANG,2013). O polimorfismo rs12904 do mir-200c está localizado na sequência seed, e, assim, prejudica a ligação com o gene-alvo e o polimorfismo rs9660710 do mir-200b altera a quantidade do miRNA expresso (LI, 2012; XIE, 2016). O gene BCL2 é considerado apoptótico, é um importante regulador da via de morte celular programada, e o equilíbrio da interação entre os produtos

dessa cascata é essencial para a regulação efetiva da sobrevivência ou apoptose celular e o controle da proliferação celular (PISTRITTO, 2016). A MO ocorre quando um limiar biológico é alcançado por meio de mecanismos coletivos que forçam a apoptose ou uma diminuição da renovação celular. Durante a resolução da lesão, o tecido responde a outra série de sinais focados na cura e recuperação (BOWEN, 2005; ANTHONY, 2006). Nesse caso, também, fatores celulares e moleculares modulam e medeiam o processo, como a morte celular por apoptose e proliferação celular. Portanto as falhas nesses mecanismos regulatórios podem estar associadas à patogênese da MO, resultando na diminuição da taxa de renovação do epitélio oral por dano tecidual e morte celular (VILLA, 2015). A amostra pesquisada consistiu de 80 DNAs de pacientes pediátricos que foram diagnosticados com LLA nos anos de 2006 a 2016, em dois hospitais públicos referência no tratamento de câncer infantil (Hospital Ophir Loyola, e Hospital Oncológico Infantil Octavio Lobo, Belém -- PA, Brasil). O tratamento inicial foi realizado de acordo com protocolo BFM2002 (Grupo Europeu Berlim-Frankfurt Münster). Os pacientes foram estratificados em grupos de risco padrão, médio e alto. Na

fase de indução todos os grupos de risco receberam o protocolo I, que consiste na administração de MTX intratecal de acordo com a idade do paciente (6 a 12 mg). Na fase de consolidação e manutenção, foram utilizadas MTX e 6-MP. A dosagem utilizada de MTX, na fase de consolidação para baixo risco ou risco intermediário, foi de 2mg/m² e para alto risco foi utilizado 5mg/m². Na fase de manutenção, os pacientes de risco baixo ou intermediários utilizaram 20mg/m² de MTX e os pacientes de alto risco utilizaram o protocolo St. Jude, que consistia em 75mg/m² de 6-MP. Os dados de toxicidade foram coletados dos prontuários dos pacientes e classificadas de acordo com NCI Common Toxicity Criteria versão 4.0. Foram incluídas exclusivamente as toxicidades graves relacionadas à MO de grau 3 -- 4 relatada para cada paciente durante o período de indução, consolidação e manutenção do tratamento. O material genético foi extraído de amostras de sangue periférico dos pacientes na remissão, utilizando o Kit comercial Biopur Kit de Extração Mini Spin Plus – 250 (Biopur, Brasil) e quantificadas utilizando o espectrofotometro NanoDrop 1000 (Termo Scientific NanoDrop 1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). A análise molecular dos polimorfismos foi realizada

com o sistema TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA), utilizando o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* JASP v. 0.14.1.0. Desse modo, foram selecionadas 80 amostras e realizado as estatísticas descritivas, referentes às variáveis ancestralidade, idade, sexo, leucometria inicial, tipo de leucemia, risco de estratificação, translocações cromossômicas e presença de mucosite. Por meio do teste qui-quadrado, compararam-se as frequências para as variáveis sexo, leucometria inicial, tipo de leucemia, risco de estratificação e translocações cromossômicas entre os grupos estudados. O teste – T foi utilizado para comparar as médias referente à idade e o Mann-Whitney para a ancestralidade. Realizou-se a regressão logística, corrigida por grupos de risco, para analisar a associação do polimorfismo genético selecionado e a incidência de MO no tratamento de LLA infantil. Dos 80 participantes, 51 (63,8%) eram do sexo masculino e 29 (36,2%) do sexo feminino, com média de idade de 5,463. Pôde-se observar as frequências das translocações cromossômicas que corresponderam (37,1%) para TCF3-PB1 e de (34,3%) para BCR-ABL, sendo elas as mais frequentes, seguido

por ETV6-RUN1 (17,1%), depois a E2A-PB1 (5,7%) e, por fim, com as mesmas frequências (2,9%) as translocações MLL-AF4 e SIL-TAL. Além disso, (28,8%) dos pacientes analisados apresentaram MO como complicação da terapia contra a LLA. O estudo também fez a análise da relação entre a ocorrência de MO em pacientes pediátricos com o diagnóstico de LLA, em terapia antineoplásica com MTX. Foi observado, a partir das análises de ancestralidade genética, que o grupo étnico europeu apresentou a média de $0,432 \pm 0,102$, seguido pela ameríndia $0,365 \pm 0,132$ e, por último, a africana $0,203 \pm 0,087$. Não foram observadas diferenças significativas referentes à ancestralidade. Quanto ao risco de estratificação, 65,2% dos pacientes que apresentaram MO encontravam-se inclusos no grupo de alto risco, em segundo lugar com 26,1% o grupo padrão e, por último, o grupo de baixo risco, com 8,7%. Para essa característica não foram observadas diferenças significativas no risco de estratificação ($p = 0,385$). Não foram observadas diferenças significativas na distribuição dos genótipos entre os grupos sem e com MO. Os polimorfismos rs9660710 e rs2505901, na forma do efeito recessivo mutante, apresentaram diferenças significativas conferindo

uma proteção em desenvolver a MO. Apenas os polimorfismos presentes em miR-200c e pre-miR-938 tiveram uma diferença estatística significativa, conferindo ao modelo recessivo mutante uma proteção ao surgimento da MO na amostra estudada.

REFERÊNCIAS

ANTHONY, L. *et al.* New thoughts on the pathobiology of regimen-related mucosal injury. **Supportive Care in Cancer**, v. 14, n. 6, p. 516-518, 2006.

BHOJWANI, D.; YANG, J. J.; PUI, C. H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 47–60, 2015.

BOWEN, J.M. *et al.* Cytotoxic chemotherapy upregulates pro-apoptotic Bax and Bak in the small intestine of rats and humans. **Pathology**, v. 37, p. 56–62, 2005.

LI, Y. *et al.* G-A Variant in miR-200c Binding Site of EFNA1 Alters Susceptibility to Gastric Cancer. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 3, p. 219-229, 2012.

LI, C. F. *et al.* miR-938 promotes colorectal cancer cell proliferation via targeting tumor suppressor PHLPP2. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 168–

173, 2017.

LOPEZ-LOPEZ, E. *et al.* Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 10, p. 1383–1398, 2014.

MISHRA, P. J. *et al.* MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. **Cell Cycle**, v. 7, n. 7, p. 853–858, 2008.

O'BRIEN, M. M.; SEIF, A. E.; HUNGER, S. P. Acute lymphoblastic leukemia in children. **Wintrobe's Clinical Hematology: Fourteenth Edition**, p. 4939–5015, 2018.

PISTRITTO, G. *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **AGING**, v. 8, n. 4, 2016.

QIN, R.; STEEL, A.; FAZEL, N. Oral mucosa biology and salivary biomarkers. **Clinics in Dermatology**, v. 35, n. 5, p. 477–483, 2017.

RIBEIRO, I. L. A. *et al.* Oral mucositis in pediatric patients in treatment for acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 12, 2017.

ROMAINE, S. P. R. *et al.* MicroRNAs in cardiovascular disease: An introduction for clinicians. **Heart**, v. 101, n. 12, p. 921–928, 2015.

SCHMIEGELOW, K. *et al.* Mercaptopurine/methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: Clinical facts and fiction. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 36, n. 7, p. 503–517, 2014.

SUN, G. *et al.* SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. **RNA**, v. 15, n. 9, p. 1640–1651, set. 2009.

TANG, H. *et al.* [miR-200b and miR-200c as Prognostic Factors and mediators of Gastric Cancer Cell Progression.](#) **Clin Cancer Res**, v.19, n. 20, Oct. 2013.

TORRUELLA-LORAN, I. *et al.* rs12416605:C>T in MIR938 associates with gastric cancer through affecting the regulation of the CXCL12 chemokine gene. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 7, n. 8, p. 832, 1 ago. 2019.

VAROL, N. *et al.* The realm of microRNAs in cancers. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 2, p. 1079–1089, 2011.

VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis: Pathobiology and management. **Current Opinion in Oncology**, v. 27, n. 3, p. 159–164, 2015.

XIE, K. *et al.* Genetic variants in regulatory regions of microRNAs are associated with lung cancer risk. **Oncotarget**, v. 26, v. 7, p. 47966-47974, 2016.