

INFLUÊNCIA DAS VARIANTES NOS GENES *HSA-MIR-499a* E *DROSHA* NA SUSCETIBILIDADE A MUCOSITE ORAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Camile de Barros LOPES

LOPES, Camile de Barros. **Influência das variantes nos genes *HSA-MIR-499a* e *DROSHA* na suscetibilidade a mucosite oral em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda.** Projeto de investigação científica, do Curso de Odontologia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2021.

Investigar a associação de polimorfismos genéticos nos microRNAs miR-499a (rs3746444) e Drosha (rs3805500 e rs10035440) e a ocorrência de mucosite oral (MO) em pacientes pediátricos portadores de leucemia linfoblástica aguda (LLA), em tratamento com MTX, foi o objetivo deste projeto de pesquisa. A LLA abrange um grupo de neoplasias linfoides caracterizado pelo crescimento clonal imaturo de células que morfológica e imunofenotipicamente se assemelham à linhagem B ou a linhagem T das células precursoras (ONCIU, 2009). Desse modo, essa 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 hematopoiéticas normais (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; HUNGER; MULLIGHAN, 2015). Os sinais e sintomas da LLA refletem o comprometimento da hematopoiese normal e o acúmulo de células linfoides malignas na medula óssea, sangue periférico e locais extramedulares, como o córtex renal e o sistema nervoso central (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Assim, as manifestações clínicas dessa patologia sucedem, como palidez, sangramentos gengivais, fadiga, febre, dor óssea, infecções causadas por neutropenia, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; IBAGY *et al.*, 2013). O tratamento da LLA é composto pela quimioterapia, radioterapia, transplante de células hematopoiéticas e imunoterapia (BASSAN; MAINO; CORTELAZZO, 2016). Dentre os quimioterápicos para tratar a LLA, tem-se o metotrexato (MTX), o qual é utilizada nas fases de consolidação e manutenção para crianças com LLA (LOPEZ-LOPEZ *et al.*, 2014). O MTX tem atividade antiproliferativa em células malignas, pois acarreta a interrupção da síntese das purinas e pirimidinas e, conseqüentemente, a formação do DNA, parando a replicação de células cancerosas (SCHMIEGELOW *et al.*,

2014). 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 (GANDHI *et al.*, 2017). A mucosa oral é um tecido úmido que reveste a superfície interna da cavidade oral, composta pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e não queratinizado, e uma lâmina própria representada pelo tecido conjuntivo frouxo e denso. As funções da mucosa oral são de proteção contra agressões mecânicas e microbiológicas, secreção, sensorial e recobrimento. Por sua função de revestimento, o epitélio oral apresenta rápida proliferação e constantemente renovação (QIN; STEEL; FAZEL, 2017). Assim, uma das toxicidades mais significativas da terapia com MTX é a 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). Estudos genéticos são realizados para compreender a patogênese da doença sendo importante destacar que variações em elementos reguladores não codificantes do genoma, como os microRNAs (miRNAs), podem ser relevantes para uma resposta adequada ao

MTX e, conseqüentemente, à prevenção de toxicidade (DROBNA; SZARZYŃSKA-ZAWADZKA; DAWIDOWSKA, 2018). Os miRNAs são pequenos ácidos ribonucleicos, de aproximadamente 21 a 23 nucleotídeos que regulam a expressão do gene pós-transcricionalmente por meio do pareamento com seu mRNA-alvo, levando à degradação (ROMAINE *et al.*, 2015). O processo de formação dos miRNAs é complexo e inicia-se no núcleo e finaliza no citoplasma, e inclui a ação de diversas enzimas e proteínas. A síntese de miRNAs ocorre a partir de miRNAs primários (Pri- miRNAs) em duas etapas pela ação de duas proteínas do tipo RNA III: DROSHA no núcleo e DICER no citoplasma; o DROSHA inicia a biossíntese de miRNAs processando Pri-MiRNAs (GUTIERREZ CAMINHO *et al.*, 2014; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014). Nota-se que essa molécula é fundamental para a homeostasia do organismo e que, quando há alterações estruturais, 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 mirRNA 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 de diversas patologias (SUN *et al.*, 2011). Polimorfismos encontrados no gene DROSHA e em genes de miRNAs foram indicados de uma possível relação com o risco do desenvolvimento de câncer, como LLA pediátrica (GUTIERREZ CAMINHO *et al.*, 2014; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014). O polimorfismo rs3805500 no gene DROSHA está relacionado a uma redução na expressão do mRNA de DROSHA, e uma alteração na maturação de pri-miRNAs e pré-miRNAs, condição ligada a progressão de vários tipos diferentes de câncer (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014). Outro SNP relatado na literatura mostra a participação do *MIR499a* (rs3746444) em diversos processos biológicos que são responsáveis pelo desenvolvimento e evolução de várias doenças (GAWISH, 2020). O rs3746444 é um SNP que é resultado da substituição de uma Adenina por uma Guanina na região *stem*, oposta à sequência do miR-499 maduro, que resulta na mudança na estrutura *stem* do

miR-499. Quando comparado ao alelo com a Adenina, a estrutura do SNP é menos estável (GAWISH, 2020). Essa mudança é relacionada ao aumento da suscetibilidade para doenças, como o câncer (DE SOUZA *et al.*, 2020). Nesse contexto, fatores genéticos desempenham um papel essencial para a homeostasia do organismo, podendo a presença de SNP em miRNA estar associada ao risco de toxicidade em crianças em tratamento para LLA (PULITO *et al.*, 2020). A LLA possui uma alta incidência dentre os casos de leucemias infantis e a região Norte do Brasil apresentando a maior taxa de incidência deste tipo de neoplasia, acima de 39%. De acordo com a literatura, as taxas de sobrevivência dos pacientes com LLA aumentaram devido ao progresso terapêutico, porém nota-se que ainda existe um elevado índice de pacientes infantis que não respondem ao tratamento quimioterápico convencional, cerca de 20% apresentam sérias complicações toxicológicas. Levantamentos epidemiológicos realizados em pacientes oriundos daquela região tratados para LLA mostraram que cerca de 60% não respondem ao tratamento quimioterápico convencional, o que contribui para um maior índice de mortalidade nessa região, comparando-se com outras regiões do Brasil. O MTX é um

dos principais agentes quimioterápicos com as melhores eficácias demonstradas contra a LLA. No entanto, devido à estreita faixa terapêutica, toxicidades significativas ao MTX ocorrem durante o tratamento da LLA causando interrupção ou descontinuação quimioterapêutica. Dentre as complicações, tem-se a MO e seu desenvolvimento tem um impacto direto na qualidade de vida do paciente, pois pode levar à dor, ao comprometimento da ingestão oral, à perda de peso, ao aumento da incidência de infecções secundárias ou sistêmicas e ao tratamento oncológico insatisfatório. A modulação no risco de desenvolver MO pode ser influenciada por polimorfismos genéticos envolvidos na regulação da proliferação celular, o que resultaria na incapacidade da renovação do tecido lesionado. Os estudos com polimorfismos em genes de microRNAs são importantes, pois podem ajudar a prever riscos de 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 diminuição dos efeitos adversos decorrentes da terapia convencional e aumento de eficácia terapêutica. Este é um estudo transversal retrospectivo. O projeto foi aprovado

pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará com número 119.649. O termo de consentimento livre e esclarecido para a coleta de amostras biológicas e dados clínicos foi assinado pelos responsáveis legais de todos os pacientes. A pesquisa foi composta por 80 pacientes pediátricos entre 1 e 15 anos de idade diagnosticados com LLA por volta dos anos de 2006 e 2013, em dois hospitais públicos de 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 Grupo Europeu Berlim-Frankfurt Münster (BFM2002). 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 (6 a 12 mg) de acordo com a idade do paciente. Na fase de consolidação e manutenção, foram utilizadas MTX e 6-MP. Para a dosagem de MTX, utilizaram-se, na fase de consolidação, 2.000 mg/m², em pacientes dos grupos de risco baixo ou intermediário, e, para alto risco, foram utilizados 5.000 mg/m². Na fase de manutenção, os pacientes receberam 20mg/m² para as categorias risco baixo ou intermediário e os de alto risco utilizaram o

protocolo St. Jude, que consistiu em 40mg/m² de MTX. Os dados de toxicidade foram coletados dos prontuários dos pacientes e classificadas de acordo com Common Toxicity Criteria (NCI) versão 4.0. Foram incluídas exclusivamente as toxicidades graves relacionadas à MO de grau 3-4 relatada para cada paciente durante as fases de consolidação e manutenção do tratamento. A molécula de DNA foi extraída 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 espectrofotômetro 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). A análise da ancestralidade genética foi realizada por meio de um painel de 61 *Ancestry Informative Markers* (AIM), conforme descrito por Santos *et al.* (2010) e Ramos *et al.* (2016). As proporções individuais de ancestrais europeus, africanos e ameríndios foram estimadas usando o *software* STRUCTURE v.2.3.3, assumindo três populações parentais (europeias, africanas

e ameríndias). As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* JASP v. 0.14.1.0. As amostra foram selecionadas para as análises estatísticas descritivas, referentes às variáveis sexo, idade do diagnóstico, leucometria inicial, translocações cromossômicas, estratificação de risco, tipo de célula, presença de MO e ancestralidade genética. Por meio do teste qui-quadrado, compararam-se as frequências das variáveis categóricas. O teste – T foi utilizado para comparar as médias referente à idade e o Mann-Whitney para a ancestralidade genética. 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. Observamos uma prevalência maior do gênero masculino correspondente a 63,8%. A média de idade foi equivalente a 5,463. Constatamos que a translocações cromossômicas mais frequente foi a TCF3-PB1 com 37,1% seguida pela BCR-ABL (34,3%). Para a ocorrência de MO, verificamos que 28,8% dos pacientes apresentaram a MO oral como complicação da terapia contra a LLA. Verificamos que a ancestralidade genética predominante foi o grupo étnico europeu com uma média de 0,432, seguido pelo ameríndio 0,365 e africano 0,203, porém

nenhum grupo apresentou diferenças estatisticamente significativas. Quanto ao risco de estratificação, pudemos perceber que 65,2% dos pacientes que apresentaram MO se encontravam 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%. Dos três SNPs investigados, dois foram associados a um efeito de proteção para desenvolver MO grave no tratamento da LLA e correspondem ao genótipo AG da variante rs3746444 do gene *MIR499a* (OR=0,31 (IC95%=2,08 – 0,260; $p= 0,012$) e no modelo dominante (TT+CT vs CC) da variante rs10035440 do gene *DROSHA* (OR=0,375 (IC95%=1,839 – 0,123; $p= 0,02$). Os achados contribuem para uma melhor compreensão do papel de polimorfismos em genes de miRNAs na modulação de risco de toxicidade no tratamento da LLA infantil, sugerindo que possam ser biomarcadores em potencial para prever a toxicidade induzida por MTX.

REFERÊNCIAS

BAHREINI, F.; RAYZAN, E.; REZAEI, N. microRNA-related single-nucleotide polymorphisms and breast

cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 3, p. 1593–1605, 2021.

BASSAN, R.; MAINO, E.; CORTELAZZO, S.
Lymphoblastic lymphoma: An updated review on biology, diagnosis, and treatment. **European Journal of Haematology**, v. 96, n. 5, p. 447–460, 2016.

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.

DE SOUZA, T. P. *et al.* Influence of variants of the drosha, mir499a, and mir938 genes on susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in an admixed population from the brazilian amazon. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 12, p. 8216–8224, 2021.

DROBNA, M.; SZARZYŃSKA-ZAWADZKA, B.;
DAWIDOWSKA, M. T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers. **Blood Reviews**, v. 32, n. 6, p. 457–472, 2018.

GANDHI, K. *et al.* Prevalence of Oral Complications occurring in a Population of Pediatric Cancer Patients receiving Chemotherapy. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 10, n. 2, p. 166–171, 2017.

GAWISH, E. *et al.* MicroRNA-499 rs3746444 polymorphism in Egyptian children with biliary atresia. **Clinical and Experimental Hepatology**, v. 6, n. 3, p. 263–269, 2020.

GUTIERREZ-CAMINO, A. *et al.* The miR-1206 microRNA variant is associated with methotrexate-induced oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 27, n. 8, p. 303–306, 2017.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukemia in children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541–1552, 2015.

IBAGY, A. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia in infants: 20 years of experience. **Jornal de Pediatria**, v. 89, n. 1, p. 64–69, 2013.

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

LÓPEZ-LÓPEZ, E. *et al.* Pharmacogenetics of MicroRNAs and MicroRNAs biogenesis machinery in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 655–674, 2009.

PULITO, C. *et al.* Oral mucositis: The hidden side of disease therapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2020.

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

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

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.

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.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic

leukemia: a comprehensive review and 2017 update.
Blood cancer journal, v. 7, n. 6, p. e577, 2017.