



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação Stricto Sensu em Oncologia**

MARCELA CRISTINA DA SILVA ROBAINA

**“PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs REGULADOS POR C-MYC NO
LINFOMA DE BURKITT”**

Orientadora: Prof. Dra Claudete Esteves Klumb

**RIO DE JANEIRO
2016**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia**

MARCELA CRISTINA DA SILVA ROBAINA

**“PERFIL DE EXPRESSÃO DE *microRNAs* REGULADOS POR C-MYC NO
LINFOMA DE BURKITT”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Orientadora: Prof. Dra Claudete Esteves Klumb

**RIO DE JANEIRO
2016**

R628p Robaina, Marcela Cristina da Silva.

Perfil de expressão de microRNAs regulados por C-MYC no linfoma de Burkitt / Marcela Cristina da Silva Robaina. – Rio de Janeiro, 2016. 123 f.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016.

Orientador: Claudete Esteves Klumb.

1. Linfoma de Burkitt. 2. Proteínas Proto-Oncogênicas c-myc. 3. MicroRNAs. 4. Sobrevida. I. Klumb, Claudete Esteves (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99442



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação Stricto Sensu em Oncologia**

Marcela Cristina da Silva Robaina

**“PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs REGULADOS POR C-MYC NO
LINFOMA DE BURKITT”**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Claudete Esteves Klumb

Aprovada em: 29/04/2016.

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Leonardo Augusto Karam Texeira
Prof. Dr. Sheila Coelho Soares Lima
Prof. Dr. Franklin David Rumjanek
Prof. Dr. Helena Lobo Borges
Prof. Dr. Beatriz de Camargo – Suplente I
Prof. Dr. Tatiana de Almeida Simão – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2016**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular – Programa de Hemato-Oncologia Molecular – Instituto Nacional de Câncer – sob orientação da professora Claudete Esteves Klumb e na *Division of Cancer Pathobiology – The Children's Hospital of Philadelphia*. e contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) para controle do câncer, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Programa de Oncobiologia/Fundação do Câncer e SWISS-BRIDGE Foundation

À minha mãe e amiga que esteve
sempre ao meu lado me motivando e
me dando todo o suporte para
conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Claudete Esteves Klumb, sempre muito comprometida com o trabalho, dedicada e competente. Sou muita grata por ter feito parte da minha formação desde a iniciação científica, pela confiança depositada no meu trabalho e principalmente por não medir esforços para a execução deste trabalho. Muito obrigada por todo incentivo e apoio que forem essenciais para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra Raquel Maia, chefe do Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, que além de nos proporcionar um excelente ambiente de trabalho é capaz de nos motivar através do seu grande entusiasmo pela ciência. Agradeço também pela oportunidade em participar de seus projetos que não estavam relacionados a esta tese de doutorado.

À Dra Roberta Soares Faccion não só pela colaboração nos projetos, mas também pelo incentivo e apoio dado durante meu doutorado sanduíche. Sem você esta jornada teria sido mais difícil!

À médica patologista, Lídia de Resende por ter participado do trabalho e pelas trocas de experiências compartilhadas ao longo desse trabalho.

Ao Dr Carlos Bacchi e equipe de Consultoria em Patologia, Botucatu, São Paulo pela colaboração estabelecida para realização das técnicas de ISH e FISH.

Ao Luciano Mazzoccoli, pelas discussões científicas, auxílio nos experimentos com linhagens celulares e contribuições para o trabalho.

À Gabriela Nestal de Moraes, pelas orientações científicas, por ter confiado no meu trabalho e principalmente pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos colegas e amigos do laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Aline, Dani, Deborah, Felipe, Flavia, Fernanda, Gabi, Gustavo, Lauana, Luciano, Marcos, Michele, Paloma, Paulinha, Rebeca, Roberta e Thaís pelo ótimo ambiente de trabalho proporcionado, pelos ensinamentos e também pelos momentos de descontração fora do laboratório.

À Patrícia Fernandes, pelo auxílio nas compras de reagentes e principalmente pela amizade e disponibilidade em ajudar em todas as horas.

À Dra Maria Theresa Accioly da Divisão de Patologia pelos recortes das peças tumorais incluídas em parafina do estudo.

À amiga Paula Sabbo pela amizade desde a faculdade e por ter compartilhado literalmente todos os momentos da minha formação ao meu lado.

À Aline Rangel que apesar de não ter incluído na tese os dados referentes ao FISH em linhagem celular, gostaria de agradecer pela colaboração e trocas de experiências.

Ao Dr Andrei Thomas-Tikhonenko chefe da Division of Cancer Pathobiology, Children's Hospital of Philadelphia, pela colaboração e por ter me aceito em seu laboratório durante um ano para desenvolvimento do doutorado sanduíche. Sou imensamente grata pela ótima recepção e pelo grande aprendizado.

Aos membros do ATT Lab: Amar, Asen, Antonio, Elena, Claudia, Colleen, Katy, Lis e Suzana por todos os ensinamentos, discussões científicas e por terem facilitado a difícil jornada de morar longe da família.

Aos membros da banca de qualificação realizada em novembro de 2014 que contribuíram bastante para a finalização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora por terem aceito gentilmente o convite.

Aos funcionários da secretária de Pós-Graduação Andreia, Daniele e Rodrigo que sempre se esforçaram para resolver as questões burocráticas enquanto aluna.

Aos meus pais que sempre me deram todo o apoio e me motivaram a avançar na minha formação. Por todo carinho e amor! Em especial a minha mãe que foi fundamental neste último ano de doutorado sanduíche. Tenho muita gratidão pelos excelentes pais que são para mim.

Ao meu namorado e grande amigo, Luciano Guerra pelo apoio e incentivo. Pelas visitas durante o momento de doutorado sanduíche, pela compreensão nos finais de semanas de trabalho, por vibrar com as minhas conquistas e por me ajudar e incentivar a seguir em frente mesmo nos momentos difíceis. Sem dúvida o seu companheirismo foi essencial para a finalização deste trabalho.

Ao meu irmão, Leo e ao meu afilhado, Pedro que são essenciais na minha vida e me motivam a prosseguir.

A Deus que me permitiu seguir pelo caminho correto e me deu forças para prosseguir sempre nesta jornada de pesquisadora.

Ao Ministério da Saúde e ao Programa de Doutorado Sanduíche (PDSE) da CAPES pelas bolsas de estudo que possibilitaram a execução deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, INCT, FAPERJ, CNPq, Programa de Oncobiologia/Fundação do Câncer e SWISS-BRIDGE Foundation.

"Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas."



**“PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs REGULADOS POR C-MYC NO
LINFOMA DE BURKITT”**

RESUMO

Tese de Doutorado

Marcela Cristina da Silva Robaina

O Linfoma de Burkitt (LB), subtipo de linfoma não Hodgkin B mais frequente na infância, é uma neoplasia hematológica altamente agressiva. A assinatura molecular é a translocação (8;14) ou suas variantes: t(2;8) e t(8;22). Ambas as translocações envolvem o proto-oncogene *c-MYC* que quando translocado é expresso constitutivamente, caracterizando a principal alteração conhecida no LB. Atualmente, tem sido demonstrado que *c-MYC* regula a expressão de vários miRNAs, dentre eles o *cluster* de miR-17-92 e a família miR-34, entre outros. Neste contexto, o balanço entre *c-MYC* e miRNAs parece ser crítico para a patogênese do LB e necessita ser melhor elucidado. Nesse estudo avaliamos a expressão dos miRNAs regulados por *c-MYC* (*cluster* 17-92: miR-17, miR-19a/b, miR-20a, miR-92a e da família miR-34) em 57 amostras tumorais de LB pediátrico. Adicionalmente, avaliamos a correlação entre os níveis de miR-17, miR-19a/b, miR-20a e miR-92a e a expressão de um dos seus principais alvos, a proteína pró-apoptótica BIM. Foi observado que níveis elevados do miR-17 e miR-20a estavam associados com a ausência da expressão de BIM ($p < 0,001$). Em sequência, observamos que o aumento do miR-17 estava fortemente correlacionado com uma sobrevida global (SG) inferior ($p = 0,007$). A análise multivariada revelou também que miR-17 foi um preditor significativo de SG encurtada. A inibição do miR-17 em linhagem de LB resultou em aumento da proteína BIM, reforçando o papel deste miRNA na regulação de BIM. Em relação aos miR-34a, miR-34b e miR-34c foram observados baixos níveis de expressão em amostras tumorais. Como esta família de miRNAs pode ser regulada por metilação investigamos se o miR-34b estaria sendo reprimido através da metilação do DNA. Então foi analisado o efeito do agente demetilante 5-aza-2-deoxycytidine (decitabina) na expressão do miR-34b em células do LB. Nas linhagens BL41, Daudi e Raji verificou-se um aumento do miR-34b em todas as concentrações de decitabina. Em seguida, detectamos que o tratamento promoveu uma diminuição de RNAm de *c-MYC* nas linhagens Daudi e Raji de 0,83 e 1,4 vezes, respectivamente, reforçando a existência de uma alça de regulação envolvendo miR-34b e *c-MYC*. Além disso, avaliamos se a estabilização proteica de *c-MYC* utilizando um inibidor de GSK3 β (CHIR 99021), alterava a expressão dos miRNAs regulados por *c-MYC* em linhagens de LB. Embora não tenha sido observada diferença significativa na expressão dos miR-17, 20a e 92a nas linhagens, o tratamento com o inibidor de GSK3 β alterou a localização subcelular da proteína DRISHA, envolvida no processamento dos miRNAs, sugerindo que a atividade de GSK3 β é necessária para o processamento dos miRNAs. Em conclusão, nossos dados sugerem que as alterações na expressão dos miRNAs (miR-17, 19a, 19b, 20a, 92a, 34a, 34b e 34c) são um evento frequente na patogênese do LB. A expressão aumentada do miR-17 provavelmente está associada com um pior desfecho no LB pediátrico. As observações referentes aos *miR-34s* no LB necessitam futuras análises com ensaios funcionais de forma a contribuir para melhor compreensão desta família de miRNAs e seus alvos na patogênese do LB.

Palavras-chaves: Linfoma de Burkitt, *c-MYC*, miR-17-92, família miR-34, sobrevida global



**“EXPRESSION PROFILE OF microRNA REGULATED BY C-MYC IN BURKITT
LYMPHOMA”**

Abstract

Marcela Cristina da Silva Robaina

Burkitt lymphoma (BL) is highly aggressive subtype of B-non-Hodgkin more frequent in childhood and associated with the translocation (8, 14) or its variations: t(2, 8) or t(8, 22). The proto-oncogene c-MYC is involved in all translocations and it is juxtaposed to *Igs* gene enhancers being expressed constitutively. It has been demonstrated that c-MYC regulates a large number of miRNAs, including the *cluster* miR-17-92 and miR-34 family. Thus, the balance between Myc and miRNAs may be critical to the BL pathogenesis and needs further elucidation. In this study, we investigated miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20 and miR-92a expression levels in a series of 57 BL tumor samples. In addition, pro-apoptotic BIM protein expression was evaluated and then compared to miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20 and miR-92a levels, and patient outcomes. We found that upregulated expression of miR-17, and miR-20a correlates with lack of pro-apoptotic BIM protein expression ($p < 0.001$). Patients bearing tumors with upregulated miR-17 displayed decreased overall survival (OS) ($p = 0.007$). Moreover, the multivariate analysis revealed that miR-17 was a significant predictor of shortened OS. Using hairpin inhibitor we showed that inhibition of miR-17 resulted in enhanced BIM expression in a BL cell line, suggesting the involvement of this miRNA in the regulation of BIM protein. Besides, low expression levels of miR-34a/b/c were observed in BL tumor samples. Next, we evaluated whether these miRNAs were suppressed by DNA methylation. So, we analyzed the effect of demethylant agent 5-aza-2-deoxycytidine (decitabine) on miR-34 expression levels in BL cell lines. We observed an increase of miR-34b levels in BL41, Daudi and Raji cell lines in all decitabine concentrations. Then, we also detected that the treatment with higher concentration of decitabine resulted in the c-MYC mRNA reduction in Daudi and Raji (0.83 and 1.4 times, respectively). In addition, we evaluated whether c-Myc protein stabilization using a GSK3 β inhibitor (CHIR 99021) could alter the expression of miRNAs regulated by c-MYC in BL cell lines. Even though no significant difference in miR-17, 20a and 92a expression levels have been observed, the treatment with GSK3 β inhibitor modified the Drosha subcellular localization, suggesting that GSK3 β activity is required for miRNAs processing. In conclusion, we described that alterations in the expression of miRNA levels (miR-17, 19a, 19b, 20a, 92a, 34a, 34b and 34c) are a frequent event in BL pathogenesis. Increased miR-17 expression is associated with a worse outcome in pediatric BL. Further functional assays are required in order to understand the role of miR-34 family in BL pathogenesis.

Keywords: Burkitt Lymphoma; c-MYC miR-17-92; miR-34 family; overall survive.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitros
μm	Micrometro
μM	Micromolar
ARF	<i>Alternating reading frame</i>
AGO	Argonauta
ATP	Adenosina -5'-trifosfato
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma extra-large protein</i>
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BIM	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BSA	Albumina sérica bovina fração V
cDNA	DNA complementar
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Tetracloro 3,3 diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMTs	DNA metiltransferases
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EBNA	Antígeno nuclear do vírus Epstein Barr
EBV	Vírus Epstein Barr
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
HDAC	Histona deacetilase
HDM2	<i>Human Double Minute-2</i>
HH	Hematoxilina de Harris
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional de Câncer

LB	Linfoma de Burkitt
LCM	Linfoma de Célula do Manto
LDGC-B	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LDH	Enzima desidrogenase láctica
LMP	Proteínas latentes de membrana
LNH-B	Linfoma não Hodgkin B
MCL-1	<i>Myeloid cells leukemia-1</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MAX	myc-associated factor X
miRNA	micro RNA
MYC	Homólogo de oncogene viral v-myc de mielocitomatose
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NF-kB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
nm	Nanometro
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para análise
PBS	Solução salina de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PUMA	<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RB	Retinoblastoma
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
SIRT 1	Sirtuína 1
SG	Sobrevida Global
STR	Short Tandem Repeat
TBS	Tampão Tris Salino (<i>Tris buffer saline</i>)
TBP	TATA <i>binding protein</i>
TE	Tampão de eluição
TMA	<i>Tissue Microarray</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Histopatologia do LB	4
Figura 1.2 Estratificação por grupo de risco para o LB.	7
Figura 1.3: Esquema ilustrativo das translocações encontradas no LB.	10
Figura 1.4: Esquema ilustrativo dos pontos de quebra do gene <i>c-Myc</i> no LB.	11
Figura 1.5: Esquema representativo dos mecanismos de regulação da transcrição gênica pelo fator de transcrição <i>c-MYC</i> .	16
Figura 1.6: Biogênese dos miRNAs pela via canônica.	21
Figura 1.7: Esquema representativo dos miRNAs envolvidos na ontogenia das células B.	25
Figura 1.8: Representação esquemática do gene <i>C13orf25</i> e do <i>cluster miR-17-92</i> .	28
Figura 1.9: Esquema representativo dos alvos regulados pelo <i>cluster miR-17-92</i> e as vias envolvidas.	30
Figura 1.10: Representação esquemática dos membros da família miR-34.	31
Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo.	47
Figura 5.1: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos pacientes com LB.	51
Figura 5.2: Curvas de Kaplan-Meier das sobrevidas globais em 5 anos.	52
Figura 5.3: Níveis relativos de expressão de miRNAs em amostras tumorais pediátricas de LB.	54
Figura 5.4: Expressão relativa do RNAm de <i>c-MYC</i> em relação a presença da translocação de <i>c-MYC</i> .	55
Figura 5.5 Detecção por imunohistoquímica da expressão citoplasmática de BIM em amostras tumorais de LB.	56
Figura 5.6: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global em cinco anos em relação à expressão da proteína BIM.	57
Figura 5.7: Análise dos níveis de miRNAs em relação a expressão da proteína BIM em amostras tumorais de LB.	58
Figura 5.8: Inibição do miR-17 utilizando o inibidor <i>hairpin</i> na linhagem Daudi.	59
Figura 5.9: Curvas de Kaplan-Meier das sobrevidas globais em 5 anos em relação aos níveis de expressão de miRNA no LB.	61
Figura 5.10: Expressão relativa do miR-34b nas linhagens BL41, Daudi e Raji.	63
Figura 5.11: Expressão relativa do miR34b em linhagens de LB após o tratamento com Decitabina.	64
Figura 5.12: Expressão relativa de <i>c-MYC</i> nas linhagens de LB tratadas com Decitabina.	65
Figura 5.13: Expressão proteica de <i>c-MYC</i> na linhagem Raji em relação ao tratamento	65

com Decitabina.

Figura 5.14: Níveis de c-MYC total e fosforilada nas linhagens Ramos e Daudi. 66

Figura 5.15: Expressão de miRNAs mediante estabilização proteica de c-MYC na linhagem Ramos. 68

Figura 5.16: Expressão de miRNAs mediante estabilização proteica de c-MYC na linhagem Daudi. 69

Figura 5.17: Avaliação da expressão do cluster miR-17-92 mediante reativação de c-MYC na linhagem P493-6. 71

Figura 5.18: Análise da localização da Drosha mediante o tratamento com CHIR na linhagem Ramos. 72

Figura 5.19: Microscopia confocal das células 293T transfectadas com Drosha-GFP selvagem e Drosha S300/302 mutante-GFP. 73

Figura 5.20: Expressão de Drosha-GFP nas frações subcelulares incubadas com CHIR por Western blotting. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Sistema de Estadiamento dos LNH pediátricos (St. Jude)	5
Tabela 1.2: miRNAs alterados no Linfoma de Burkitt	27
Tabela 5.1: Características Clínicas e Biológicas dos pacientes com LB	49
Tabela 5.2 Características clínicas-biológicas dos pacientes c-MYC não translocado	49
Tabela 5.3 Análise entre os casos positivos e negativos para translocação de c-MYC	50
Tabela 5.4: Valores da quantificação relativa dos miRNAs nas amostras de LB.	53
Tabela 5.5 Impacto do miR-17 no prognóstico do LB através da análise multivariada	62
Tabela 5.6: Expressão de miRNAs da família miR-34 em relação à sobrevida dos pacientes com LB	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Linfoma não Hodgkin B na Infância e Adolescência	01
1.2 Linfoma de Burkitt	02
1.2.1 Variantes clínicas do LB.....	02
1.2.2 Características Histopatológicas e Imunofenotípicas do LB.....	04
1.2.3 Características Clínicas e Tratamento.....	05
1.3 Patogênese do LB.....	07
1.3.1 O papel do EBV no LB	07
1.3.2 Eventos genéticos e moleculares do LB.....	09
1.4 O proto-oncogene <i>c-Myc</i>	14
1.4.1 Localização e função	14
1.4.2 Alvos e efeitos da desregulação de c-MYC.....	17
1.5 MicroRNAs.....	19
1.5.1 Histórico, biogênese e função.....	19
1.5.2 miRNA na maturação linfóide B.....	23
1.5.3 miRNAs e linfomas.....	25
1.5.4 Cluster <i>miR-17-92</i>	27
1.5.5 A família <i>miR-34</i>	30
1.6 Justificativa para o estudo.....	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Geral	35
2.2 Específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Seleção de pacientes e controles.....	36
3.2 Obtenção dos dados clínicos e demográficos dos pacientes.....	36
3.3 Detecção do vírus Epstein-Barr em amostras tumorais de LB.....	37
3.4 Análise da translocação envolvendo c-MYC por FISH.....	37
3.5 Linhagens celulares.....	37
3.5.1 Tratamento das linhagens celulares.....	37
3.6 Extração de RNA e miRNA de amostras tumorais de LB incluídas em parafina.....	38
3.7 Extração de RNA de linhagens celulares.....	38

3.8	Quantificação de RNA.....	38
3.9	Síntese de cDNA.....	39
3.10	PCR em tempo real	39
3.10.1	Quantificação dos níveis de RNAm.....	39
3.10.2	Quantificação dos níveis de microRNAs.....	40
3.11	Detecção da proteína BIM por imunistoquímica.....	40
3.12	Western Blotting.....	42
3.13	Transfecção com inibidor de miR-17.....	44
3.14	Vetores plasmidiais.....	44
3.15	Transfecção celular.....	45
3.16	Microscopia confocal.....	45
3.17	Fracionamento subcelular.....	46
3.18	Análise estatística.....	46
4	DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Características clínicas e demográficas dos pacientes com LB.....	48
5.2	Resposta ao tratamento dos pacientes com LB.....	51
5.3	Quantificação dos níveis de miRNAs em amostras tumorais de LB	53
5.4	Expressão de RNAm de c-MYC não está correlacionada com os níveis de expressão dos miRNAs do <i>cluster</i> 17-92.....	54
5.5	Expressão proteica de BIM não foi associada com a sobrevida dos pacientes com LB.	56
5.6	Altos níveis dos miR-17 e miR-20a foram correlacionados com ausência da expressão proteica de BIM em amostras tumorais de LB.....	57
5.7	Inibição do miR-17 em linhagem de LB leva ao aumento dos níveis de BIM.....	59
5.8	Expressão alta de miR-17 foi associada a uma pior sobrevida no LB pediátrico.....	60
5.9	A baixa expressão do miR-34 não teve impacto no prognóstico do LB.....	62
5.10	A Decitabina alterou o nível de expressão do miR-34b nas linhagens de LB.....	63
5.11	Os níveis de RNAm de <i>c-MYC</i> foram alterados pela Decitabina nas linhagens de LB	64
5.12	A estabilização da proteína c-MYC não alterou a expressão de miRNAs do <i>cluster</i> 17-92.....	66
5.13	A inibição de c-MYC reduz a transcrição do <i>cluster</i> miR-17-92.....	70
5.14	O tratamento com CHIR pode modular a localização da Drosha.....	71
5.15	A Drosha S300/302 mutante localiza-se no citoplasma.....	72

6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	87
8 PERSPECTIVAS	88
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
10 ANEXOS	110
10.1 Trabalho científico publicado referente à tese de doutorado.....	110
10.2 Trabalho científico publicado tendo sido desenvolvido em paralelo ao projeto de tese de doutorado.....	121
10.3 Trabalho científico publicado não relacionado à tese de doutorado e desenvolvido durante o mestrado.....	122
10.4 Trabalhos científicos publicados em colaboração, não relacionados à tese de doutorado cuja colaboração ocorreu durante o doutorado.....	122
10.4.1 An unusual long-term outcome of a child with primary myelofibrosis harboring a JAK2 mutation.....	122
10.4.2 FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance.....	123
10.4.3 NFAT2 Isoforms Differentially Regulate Gene Expression, Cell Death, and Transformation through Alternative N-Terminal Domains.....	123
10.4.4 Langerhans cell histiocytosis: differences and similarities in long-term outcome of paediatric and adult patients at a single institutional centre.....	123
10.4.5 Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt's lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101.....	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Linfoma não Hodgkin B na Infância e Adolescência

Os Linfomas não Hodgkin B (LNH-B) compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias linfóides originadas através de várias alterações moleculares durante o processo de diferenciação do linfócito B, podendo ocorrer expansão clonal destas células em diferentes estágios de sua maturação. A classificação dos subtipos de LNH-B tem como base a contrapartida da célula normal e as alterações genéticas e moleculares detectadas em cada subtipo. Geralmente as translocações cromossômicas que ocorrem durante diferentes etapas da diferenciação da célula B são reconhecidas como o evento inicial da transformação maligna dessas células. (NOGAI *et al.*, 2011).

Os LNH-B na infância correspondem a 10% das neoplasias nesta faixa etária (GUALCO *et al.*, 2010). Nas últimas décadas tem sido demonstrado um aumento da incidência dos LNH principalmente em adultos (CLARKE *et al.*, 2006). Não é totalmente conhecido ainda o motivo deste aumento, mas acredita-se que possa estar associado ao aumento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou por imunossupressão decorrente do aumento do número de realização de transplantes de órgãos sólidos (BORNKAMM *et al.*, 2009).

Os LNH-B da infância e adolescência apresentam-se bastante diferentes daqueles que acometem os adultos em relação à prevalência dos subtipos histológicos, comportamento biológico, tratamento e ao desfecho clínico. Em indivíduos adultos os linfomas geralmente são de baixo e intermediário grau de malignidade predominando o linfoma difuso de grandes células B (LDGC-B), enquanto que em crianças, são quase exclusivamente linfomas de alto grau de malignidade (SANDLUND *et al.*, 1996). Na infância o subtipo mais frequente de LNH-B é o Linfoma de Burkitt (LB), representando cerca de 50% dos casos, seguido do LDGC-B (BURKHARDT *et al.*, 2011). Tanto o LB quanto o LDGC-B são linfomas derivados de um linfócito B do centro germinativo e apresentam características clínicas semelhantes na infância.

1.2 Linfoma de Burkitt

O LB foi descrito em 1958 por Denis Burkitt na África ao observar crianças com rosto disforme e, em alguns casos, com uma massa tumoral no abdômen (BURKITT *et al.*, 1958). A incidência deste tumor é maior em regiões onde a malária é endêmica como a África equatorial. A taxa de incidência nesta região é de 5-10/100.000 crianças e representa cerca de 70% dos tumores da infância (van den BOSCH, 2004). Nos Estados Unidos e outras regiões como Europa, a incidência é 50 vezes menor, e por isso são consideradas regiões de baixo risco (FERRY, 2006). Já no Brasil, os dados epidemiológicos referentes ao LB mostram uma incidência muito semelhante àquela observada nas regiões não endêmicas como Estados Unidos e Europa (SANDLUND *et al.*, 1997; KLUMB *et al.*, 2003 OLIVEIRA FERREIRA *et al.*, 2012).

A alta incidência do tumor na região da África levou os pesquisadores a procurarem por uma associação com um agente causal. Desse modo, em 1964, Epstein e colaboradores identificaram o vírus denominado de Vírus Epstein-Barr (EBV) em cultura de células de biópsia de pacientes com LB (EPSTEIN *et al.*, 1964). No entanto, a associação do EBV com o tumor pode variar de 10% a 98% de acordo com a região geográfica. Os mecanismos de participação do EBV na gênese do tumor ainda não foram totalmente elucidados (BORNKAMM, 2009). Sabemos até o momento que o vírus não é um causador do LB, mas pode sim contribuir para sua patogênese especialmente na África Equatorial atuando como um importante co-fator em associação com a malária.

1.2.1 Variantes clínicas do LB

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) são descritas três variantes clínicas para o LB com base na incidência e localização geográfica. A caracterização de cada subtipo é mostrada a seguir:

- **Endêmico** – relacionados aos casos originados na região da África Equatorial e da Papua Nova Guiné, ou seja, região onde a Malária é endêmica e o tumor também é a neoplasia mais frequente. Acomete sítios extranodais como a região mandibular e órbita, e com menor frequência a região do abdômen e os órgãos do

sistema endócrino como ovário (JAFFE *et al.*, 1999). Usualmente está associado ao EBV, 98% dos casos (BRADY *et al.*, 2008).

- **Esporádico** – denominação para os casos que ocorrem fora da África e têm baixa incidência (FERRY, 2006). Os pacientes também apresentam acometimento extranodal, porém a região mais acometida é a abdominal podendo também ocorrer envolvimento de medula óssea (SANDLUND *et al.*, 1996). Em geral, esses casos apresentam uma baixa associação com o EBV (5-10%). No entanto, no Brasil, a associação tem sido mais elevada e varia com a região geográfica. No estado da Bahia foi relatada uma associação com o vírus de quase 90% (ARAUJO *et al.*, 1996). No estado do Rio de Janeiro nosso grupo também demonstrou uma frequência elevada, variando de 60%-70% (KLUMB *et al.*, 2003; HASSAN R *et al.*, 2008).
- **Associado à imunodeficiência** – principalmente observado em pacientes portadores do HIV. Em geral, o tumor desenvolve-se antes que uma severa imunossupressão seja detectada coincidindo com o início da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (KNOWLES, 2003). A frequência de associação ao EBV nestes casos é de 30 a 40%. Esta variante, normalmente, acomete linfonodos, região abdominal, medula óssea e sistema nervoso central (POWLES *et al.*, 2000).

Os linfomas, inclusive o LB, também podem ser associados à imunossupressão em indivíduos submetidos a transplante de órgãos, sendo diagnosticados tardiamente à realização do transplante, aproximadamente 4,5 anos após o procedimento (GONG *et al.*, 2003). A maioria desses pacientes foram submetidos à transplante de órgãos sólidos, sendo um evento mais raro após transplante de medula óssea (GONG *et al.*, 2003). Dados da literatura sugerem que o EBV tenha um papel importante na patogênese desses linfomas, pois há uma frequência elevada de associação do EBV detectado no tumor e no plasma desses pacientes (XICOY *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2008).

1.2.2 Características Histopatológicas e Imunofenotípicas do LB

Todas as formas do LB apresentam similaridade histopatológica e são originadas de linfócitos B maduros (GEMMA & RICKINSON, 2007). O LB é caracterizado por um elevado índice mitótico, acompanhado também de apoptose celular observada pela presença de macrófagos tissulares que mostram restos nucleares (MITCHELL *et al.*, 2005). O alto índice mitótico é indicado pela elevada expressão do antígeno Ki67, marcador de proliferação celular, presente em mais de 95% das células do LB (GEMMA & RICKINSON, 2007). Os macrófagos aparecem intercalados com as células tumorais proporcionando, microscopicamente, um aspecto de céu estrelado, uma particularidade do LB (Figura. 1.1). As células do LB apresentam morfologia uniforme, de tamanho médio e com núcleo circular, apresentando vários nucléolos e uma quantidade moderada de citoplasma (FERRY, 2006). Trata-se de um tumor de células B mais diferenciadas que expressam em sua superfície IgM (WIELS *et al.*, 1982), marcadores de célula B como: CD19, CD20, CD22 e marcadores do centro germinativo como: CD10 e BCL6 (BLUM *et al.*, 2004).

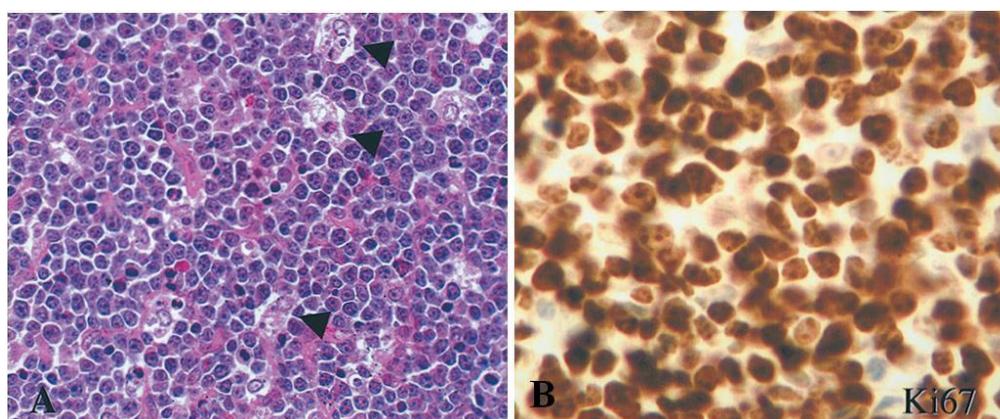


Figura 1.1: Histopatologia do LB. Em (A) característica de “céu estrelado” do tumor. As setas mostram macrófagos fagocíticos (x200). Em (B) Imunomarcação da expressão do antígeno Ki67, marcador de proliferação celular, mostrando uma forte expressão nuclear característica do alto índice de proliferação das células do LB (x400). Adaptado de HECHT, 2000.

1.2.3 Características Clínicas e Tratamento dos LNH-B

A maioria dos tumores aparece localizada em algum sítio extraganglionar. Os sítios acometidos vão depender da variante do LB. Na forma endêmica, observa-se acometimento mandibular e maxilar e também se observa uma preferência pelo comprometimento de órgãos abdominais como: rim, ovários e trato gastrointestinal, podendo também acometer o sistema nervoso central e região para-espinhal (MAGRATH, 1997; DIEBOLD, 2001). Já no LB esporádico, o local preferencial é o abdômen, especialmente a região ileocecal, e apenas 14% dos pacientes apresentam acometimento de mandíbula que, normalmente, também está associado ao comprometimento da medula óssea (MAGRATH, 1997; DIEBOLD, 2001).

O estadiamento dos pacientes é realizado segundo o sistema *St Jude* que foi descrito por Murphy em 1980 para LNH pediátricos. De acordo com alguns parâmetros os pacientes são classificados de I a IV dependendo da localização da doença. Os estágios I e II se referem à doença limitada e III e IV à avançada (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Sistema de Estadiamento dos LNH pediátricos (St. Jude)

Estágio	Sítios Acometidos
I	Tumor único (nodal ou extranodal)
II	Duas ou mais áreas nodais do mesmo lado do diafragma Doença intra abdominal completamente ressecável
III	Duas ou mais áreas nodais em lados opostos ao diafragma Tumor intratorácico Doença abdominal localizada e não ressecável Tumores paraespinhal ou epidural
IV	Qualquer um acima com acometimento do sistema nervoso central e/ou medula óssea

Adaptado de LINCH, 2012.

A resposta inicial ao tratamento é o fator preditivo de resposta ao tratamento mais importante, uma vez que pacientes que atingem menos de 20% de redução da doença na primeira fase do tratamento apresentam uma sobrevida livre de eventos em torno de 30%

(PATTE *et al*, 2007). Alterações citogenéticas envolvendo, ganho de 7q ou deleção 13q, também têm sido associadas a uma menor sobrevida (POIREL *et al*, 2009; NELSON *et al*, 2011). O prognóstico da doença é determinado de acordo com a carga tumoral que é avaliada pelo estágio da doença, nível da enzima lactato desidrogenase (LDH), e pelo acometimento de medula óssea e sistema nervoso central (PATTE, 1998).

A enzima LDH é o único marcador biológico utilizado no LB, porém tem baixa especificidade uma vez que pode estar aumentada em outras neoplasias, como câncer de pulmão, mama e em outras alterações patológicas como infarto do miocárdio, pneumopatias, pancreatite, dentre outras (JURISIK, 2015). Altos níveis de LDH estão relacionados ao efeito *Warburg* que se refere à capacidade da célula tumoral de produzir ácido láctico mesmo em condições aeróbicas. Sendo assim, as células tumorais realizam a glicólise anaeróbica, convertendo piruvato à lactato mesmo na presença de oxigênio, aumentando os níveis de LDH, enzima que catalisa esta reação. Contudo, concentrações elevadas de LDH também podem ser decorrentes da ativação transcricional de LDH-a por c-MYC (SHIM, 1997).

O tratamento do LB é considerado uma emergência oncológica, sendo necessário rápido diagnóstico e determinação do estágio, para planejamento e início da terapia (PATTE, 2003), uma vez que o tumor tem um elevado índice de proliferação, podendo dobrar de tamanho em até 24 horas (DIEBOLD, 2001). Atualmente, também se utiliza a estratificação em grupo de risco de acordo com dois grandes grupos: Francês, Americano, Britânico (FAB) e Berlin–Frankfurt–Munster (BFM) o que vem sendo responsável pelo aprimoramento no tratamento resultando em um aumento na sobrevida global dos pacientes (Figura. 1.2) (MILES *et al.*, 2012). No início da década de 80 (ANDERSON *et al.*, 1983), o esquema de tratamento foi reformulado e introduzida uma terapia intensiva e de curta duração o que resultou em excelentes resultados com taxas de cura de até 90% para os grupos de baixo risco (REITER *et al.*, 1999; PATTE, 2001).

oncogênico (BURKITT, 1983). O EBV é um gama-herpesvirus pertencente à família *herpesviridae* e é amplamente distribuído pelo mundo. Aproximadamente 95% da população já foi infectada pelo EBV, porém a maioria teve a infecção de forma assintomática (BRADY *et al.*, 2008). Os linfócitos B são o alvo da infecção que é do tipo latente isto é, sem replicação viral (MITCHELL *et al.*, 2005). Diversos estudos têm relatado que as proteínas do EBV estão associadas com a transformação maligna, desregulando os sinais normais de proliferação e sobrevivência em células com infecção latente (MANET *et al.*, 1998; BAUMFORTH *et al.*, 1999). A identificação do genoma do EBV em todas as células tumorais possibilitou concluir que a infecção pelo EBV é monoclonal e precede, ou ocorre concomitantemente à transformação maligna da célula B. Dessa forma, a ideia de que o vírus exerce um importante papel na gênese do tumor é reforçada (BRADY *et al.*, 2008). No entanto, estudos sugerem que fatores adicionais também possam estar envolvidos no potencial cancerígeno do EBV. Infecções como a malária, HIV e o estado de imunodepressão aumentam o número de células B infectadas pelo EBV (KLUMB, 2001).

A maneira pela qual o EBV contribui para a patogênese do LB ainda não foi totalmente esclarecida. Entretanto, dois modelos foram propostos. O primeiro modelo reforça que o EBV exerce um papel de potencializador na formação do tumor, mas com pouco efeito na manutenção (HECHT & ASTER, 2000). Este modelo propõe que a infecção aguda promova uma expansão policlonal das células B infectadas. O padrão de expressão gênica do EBV é o de latência III onde o vírus expressa seis antígenos nucleares ([EBNA] 1, 2, 3A, 3B, 3C, LP) e as proteínas latentes de membrana (LMP1, LMP2A e LMP2B) (KLEIN *et al.*, 1996). Esse padrão de expressão gênica está associado com a proliferação e transformação das células B *in vitro*. Desse modo acredita-se que a estimulação da proliferação da célula B aumente a probabilidade de ocorrência do rearranjo de *c-Myc* (HECHT & ASTER, 2000).

Já o segundo modelo, que não exclui a hipótese do primeiro modelo leva em consideração que o padrão de expressão gênica do EBV das células do LB é diferente dos imunoblastos B infectados (LYONS & LIEBOWITZ, 1998). Este padrão de latência está correlacionado com a diminuição da expressão de moléculas de adesão, HLA de classe I e proteínas imunogênicas do EBV que facilitam que as células infectadas escapem do

sistema imunológico (BORNKAMM, 2009). No entanto, o que também se especula é que os dois modelos propostos sejam integrados. Sendo assim, primeiramente o padrão de expressão leva a uma proliferação celular. Em seguida, ocorre a translocação envolvendo *c-Myc* e então o padrão de latência é alterado a fim de que células transformadas e infectadas não sejam reconhecidas pelo sistema imune (HECHT & ASTER, 2000).

Geralmente os vírus oncogênicos são capazes de desregular os pontos de checagem do ciclo celular tendo como alvo principal a proteína p53. No entanto, estudos demonstraram que p53 não é o principal alvo do EBV no processo de transformação neoplásica da célula B (O'NIONS & ALLDAY, 2003). A diminuição da expressão da proteína pró-apoptótica BIM (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) da família BCL-2, tem sido apontada como um importante alvo do EBV durante a infecção latente em células B (ANDERTON *et al.*, 2008). Porém, ainda é desconhecido o mecanismo exato pelo qual o EBV tem o efeito de modular a expressão de BIM. Estudos recentes mostraram que as oncoproteínas EBNA3A e EBNA3C do EBV contribuem para diminuição da expressão de BIM promovendo alterações epigenéticas como metilação da região promotora de *Bim* e desacetilação das histonas H3 e H4 que ocasionando uma compactação da cromatina, reprimindo a transcrição gênica (ANDERTON *et al.*, 2008; PASCHOS *et al.*, 2009). Além disso, a expressão de BIM também é regulada por microRNAs (miRNAs) que serão detalhados em outro tópico (OLIVE V *et al.*, 2009).

Recentemente foi descrito que o EBV através da oncoproteína EBNA1 induz a expressão de miRNAs celulares, alterando a homeostase celular e cooperando para tumorigênese do LB (ONNIS *et al.*, 2012). Adicionalmente, um estudo avaliou o perfil de expressão dos miRNAs em amostras tumorais de LB EBV positivas e negativas e mostrou que alguns miRNAs estão diferentemente expressos, reforçando, desse modo, o envolvimento do EBV na patogênese do LB (AMBROSIO MR *et al.*, 2014).

1.3.2 Eventos genéticos e moleculares do LB

O LB é caracterizado pela superexpressão do proto-oncogene *c-Myc* que é um fator de transcrição primordial na regulação das células B, capaz de reprimir e ativar genes que estão envolvidos em diversos processos celulares como o controle do ciclo celular, proliferação, apoptose, metabolismo, síntese de ácidos nucleicos e outros (BOXER &

DANG, 2001; CAI et al, 2015). Na maioria dos casos a expressão aumentada de *c-MYC* é decorrente da translocação entre as regiões do cromossomo 8, na banda 24q, com um dos genes das imunoglobulinas (*IgH*, *IgK* ou *IgL*). Em 80% dos casos a translocação 8;14 está presente, e o gene *c-Myc* é translocado do cromossomo 8 para o gene da cadeia pesada da *IgH* no cromossomo 14 (HEIM & MITELMAN, 1995). Os outros 20% correspondem às translocações variantes t(8;22) e t(2;8) envolvendo os genes das *IgL* e *IgK*, respectivamente, onde parte das cadeias leves são transferidas para o cromossomo 8 (HEIM & MITELMAN, 1995). Em ambos os casos ocorre a fusão do gene *c-Myc* com o gene da região constante da *Ig* (KLUMB, 2001) (Figura. 1.3). No entanto, cerca de 15% dos casos de LB não apresentam a translocação envolvendo *c-Myc* demonstrando que outros mecanismos também estão envolvidos na superexpressão de *c-MYC* tais como amplificação gênica, mutação, polimorfismos na região 8q24, e a diminuição da expressão do micro-RNA 34b (LEUCCI, 2008; CAI et al, 2015).

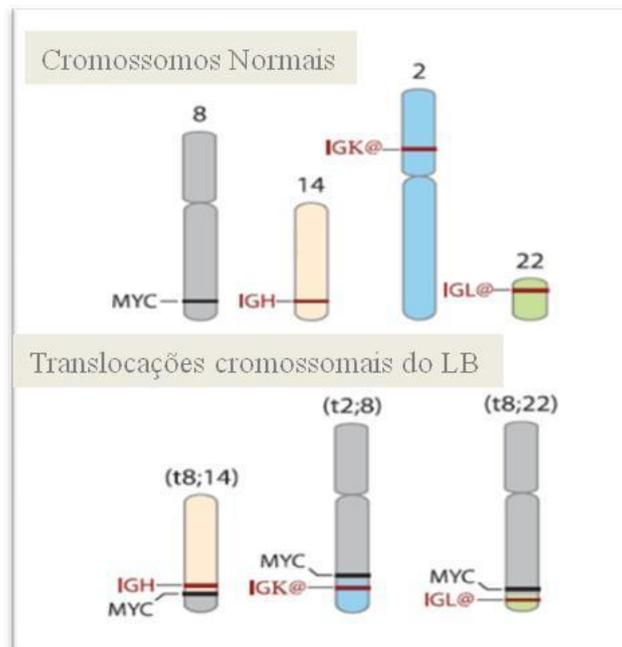


Figura 1.3: Esquema ilustrativo das translocações encontradas no LB. As translocações t(8;14), t(8;22) e t(2;8) são ilustradas. Adaptado de KLAPPROTH & WIRTH, 2010.

O ponto de quebra do gene *c-Myc* ocorre em regiões distintas nas variantes do LB. No LB esporádico e no associado à imunodeficiência, o ponto de quebra é mais comum

no éxon 1 ou no íntron 1. Já no LB endêmico, a quebra acontece distante das sequências codificadoras e regulatórias do gene (100 Kb no sentido 5' do éxon 1) (MAGRATH, 1997). Nos genes das imunoglobulinas, o ponto de quebra também é diferente entre as variantes da doença (SHIRAMIZU, 1991). No entanto, independente do ponto de quebra, a região codificadora do gene *c-Myc* é transferida intacta, pois o primeiro éxon não é codificante. Após a justaposição, *c-Myc* passa a ser regulado por elementos *enhancers* do gene da *Ig* (KLUMB, 2001). Devido ao fato dos elementos *enhancers* de *Ig* serem especificamente ativos em células B maduras, a justaposição ao *c-Myc* gera inapropriadamente elevados níveis de RNA mensageiro e da proteína c-MYC. Adicionalmente, também ocorre a remoção de regiões reguladoras negativas de *c-Myc* como uma consequência direta das translocações ou através de mutações contribuindo ainda mais para o aumento da atividade de c-MYC (HECHT & ASTER, 2000). (Figura 1.4)

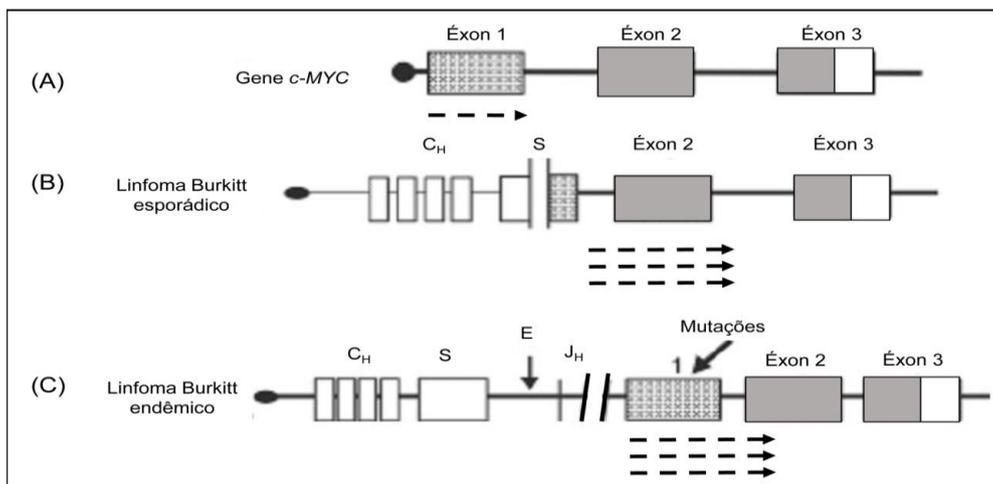


Figura 1.4: Esquema ilustrativo dos pontos de quebra do gene *c-Myc* no LB. Em A, representação gráfica do gene *c-Myc* com os três exons. Regiões codificadoras de proteínas estão representadas em cinza. Em B, ponto de quebra dentro do éxon 1 no LB esporádico, o início da transcrição passa a ser no íntron 1 (seta tracejada). Em C, ponto de quebra no LB endêmico, preservando o éxon 1, porém, há mutações nesta região que leva a perda do controle da transcrição de *c-MYC*. C_H, região constante da cadeia pesada; S, região *switch*; E, segmento *enhancer*; J_H, região combinação. Adaptado de GOLDSBY & CARROLL, 1998.

Apesar da superexpressão de c-MYC nas células B levar a um aumento da proliferação celular, para contrabalancear este efeito também ativa a morte celular

programada (apoptose) (PACKHAM & CLEVELAND, 1995). Dessa forma, são ativadas vias de morte celular dependentes e independentes de p53 resultando em apoptose (CHERNEY, 1995). Myc pode ativar tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca da apoptose, promovendo um aumento da transcrição de genes pró-apotóticos como *TP53* e *P14^{ARF}* e diminuição da expressão de genes anti-apotóticos como o *Bcl-2* (MEYER, 2006). Assim, alterações adicionais são necessárias para o desenvolvimento do LB a fim de neutralizar os efeitos apoptóticos gerados pela expressão aumentada de c-MYC.

A proteína supressora tumoral p53 é denominada a guardiã do genoma celular, atuando no controle do ciclo celular, reparo do DNA ou na ativação da morte celular programada -apoptose- em resposta a sinais de estresse. Em diversos tipos de câncer encontra-se desregulada por mutações, ou ocorrem alterações em sua via de ativação (VOUSDEN & PRIVES, 2005). Os níveis de p53 normalmente são baixos na célula, pois são controlados pelo regulador negativo HDM2 (*Human Double Minute-2*). A proteína MDM2 é o maior regulador de p53 funcionando como uma E3-ubiquitina ligase. A MDM2 liga-se à p53, inibe sua atividade transcricional e promove sua exportação do núcleo para o citoplasma onde induz a sua degradação dependente de proteossoma. A proteína antagonista de HDM2 é p14^{ARF} que é considerada uma proteína supressora tumoral atuando na inibição da função de HDM2, promovendo um aumento da atividade de p53 (HOFFMAN & LIEBERMANN, 2008). Desse modo, a perda de p14^{ARF} e/ou p53 resulta em uma maior sobrevivência da célula. Cerca de um terço dos LB possuem inativação de p53 por mutação (FARRELL *et al.*, 1991). Um estudo realizado pelo nosso grupo encontrou 20% de mutação em p53 no LB pediátrico (KLUMB *et al.*, 2003). No entanto, alterações em algum ponto da via p53/ARF/HDM2 têm sido sugeridas como importantes eventos na patogênese do LB, uma vez que a maioria das linhagens celulares derivadas do LB tem alteração nesta via (LINDSTROM *et al.*, 2001).

Alterações em vias que controlam a proliferação celular como, p16^{INK4A}, também têm sido demonstradas como eventos importantes na patogênese do LB. P16^{INK4A} promove parada no ciclo celular através da inibição das cinases dependentes de ciclinas 4 ou 6, (CDK4 ou CDK6) (SERRANO *et al.*, 1996). P16 liga-se às CDK4/6 inibindo a formação do complexo entre a ciclina D e a CDK 4/6 que é responsável pela fosforilação de membros da família Rb. À medida que permanece não fosforilada, Rb liga-se

fortemente ao E2F, um fator de transcrição de genes que codificam proteínas que regulam a progressão do ciclo celular da fase G1 para S e, conseqüentemente, a proliferação celular (SERRANO *et al.*, 1996). Desse modo, a perda da expressão de P16 tem um impacto na regulação de um grupo de genes envolvidos no controle da progressão do ciclo celular, permitindo que a célula entre na fase S, ultrapassando o ponto de checagem G1/S (SHERR & ROBERTS, 1995). Em um estudo recente de nosso grupo, foi observada inativação de P16INK4a em amostras tumorais pediátricas de LB sendo detectada a metilação da região promotora do gene *P16INK4a* (ROBAINA *et al.*, 2015) em 72% dos casos. Mutações no gene do retinoblastoma (RB2/p130) que está abaixo da via de P16INK4a foram relatadas no LB endêmico em associação com elevados níveis de proliferação celular (CINTI *et al.*, 2000). No entanto, no LB esporádico do Brasil mutações no gene *RB2/p130* foram relatadas como um evento raro e, provavelmente, sem envolvimento na patogênese do LB (KLUMB *et al.*, 2008).

Recentemente, foi demonstrado que a via de PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase) que atua na ativação de várias vias de sinalização intracelular regulando proliferação, crescimento, metabolismo e sobrevivência da célula, coopera juntamente com c-MYC na patogênese do LB (SCHMITZ *et al.*, 2012). Tal descoberta possibilitou o desenvolvimento de um modelo de camundongo que expressando c-MYC e PI3K constitutivamente, desenvolveu linfoma com características histológicas semelhantes ao LB (SANDER *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi relatado que o tratamento combinado de inibidor de histona deacetilase com inibidor de PI3K resulta na inibição da proliferação celular em linhagens derivadas do LB, destacando, o papel da via de PI3K como um importante alvo terapêutico (FERREIRA *et al.*, 2015) no LB.

Mutações pontuais na treonina 58 do gene *c-Myc* translocado têm sido frequentemente observadas em células do LB (SEARS, 2004). Esta mutação impede a fosforilação da treonina 58 resultando num aumento da estabilidade da proteína c-MYC afetando seu potencial apoptótico (HEMANN *et al.*, 2005). Além disso, essa mutação também tem como efeito o bloqueio da capacidade que MYC possui de induzir a expressão da proteína pró-apoptótica BIM (O'CONNOR *et al.*, 1998). Desse modo, a mutação na T58 representa um importante mecanismo pelo qual c-MYC promove a proliferação celular e evasão da apoptose.

1.4 O proto-oncogene *c-Myc*

1.4.1 Localização e função

O gene viral *v-Myc* foi identificado, em 1977, a partir do retrovírus MC29 causador da mielocitomatose em aves (SHEINESS D *et al.*, 1979). Em seguida, foi identificada a sequência homóloga em humanos no LB numa translocação envolvendo a região 8q24 e os genes da cadeia pesada ou leve das imunoglobulinas, localizadas nos cromossomos 14, 2 ou 22 respectivamente, e então, denominado de *celular MYC* (*c-MYC*) (DALLA FAVERA *et al.*, 1982; TAUB *et al.*, 1982). A família MYC é formada de três fatores de transcrição conservados (*c-*, *N-* e *L-MYC*) que atuam na proliferação de células somáticas e germinativas, no metabolismo celular e na progressão do ciclo celular. Desse modo, MYC ativa ou reprime uma ampla variedade de genes, compreendendo cerca de 10% do genoma humano (FERNANDEZ PC *et al.*, 2003).

Em células normais, a expressão de MYC é estritamente regulada pelos sinais mitóticos. Além disso, tanto o RNAm quanto a proteína codificada por MYC possuem uma meia vida curta em torno de 10 e 25 minutos, respectivamente, e na ausência de sinais de proliferação, os níveis de MYC são rapidamente reduzidos (SOUCEK & EVAN, 2010). Durante diferentes estágios de desenvolvimentos dos linfócitos ocorre uma variação dos níveis de MYC, sendo mais expresso nas células que estão proliferando. Desse modo, a expressão de MYC nas células B do centro germinativo (CG) é um evento importante para a linfomagenese B em humanos, pois a maioria dos linfomas são provenientes de células B do CG e frequentemente associados a translocações envolvendo MYC (SEWASTIANIK, *et al.*, 2014).

O gene *c-Myc* é constituído de três éxons, sendo o primeiro não codificante. Codifica uma fosfoproteína nuclear de meia vida curta. A porção N-terminal contém três sequências conservadas, denominadas MYC-boxes (MB) I, II e III. Essas sequências são essenciais para a estabilização da proteína, para promover a interação entre proteínas e ativação, ou repressão transcricional de seus alvos (ADHIKARY & EILERS, 2005). A porção C-terminal é constituída do domínio zíper de leucina hélice-volta-hélice o qual

possibilita a interação entre MYC e o fator de transcrição MAX (myc associado fator X) (BLACKWOOD, 1991). A interação com MAX é necessária para promover a ligação de MYC com regiões específicas de DNA (E-boxes) do promotor de genes alvos. Dessa forma, o heterodímero MYC/MAX modula a transcrição gênica através da formação de um complexo de coativadores específicos. Durante a formação desse complexo são recrutadas histonas acetiltransferases como P300 e CBP, dentre outras, que induzem o remodelamento da cromatina (GRANDORI C, *et al.*, 2000). Várias sequências de DNA são reconhecidas como um E-box de MYC/MAX dentre eles a sequência 5-CACGTG-3' que pode sofrer metilação do resíduo CpG central, impedindo a ligação de MYC e formação do complexo e, conseqüentemente, repressão da transcrição gênica (PRENDERGAST GC, *et al.*, 1991). Outra forma de inativação da transcrição gênica, e também a mais bem estudada, é através da ligação do heterodímero (MYC/MAX) com o fator MIZ-1 e P300, que recruta as DNA metiltransferases (DNMT3A e DNMT3B), promovendo o silenciamento de genes alvos (BRENNER C, *et al.*, 2005). Além disso, MAX pode formar um homodímero (MAX/MAX) e também heterodímeros com outras proteínas, tais como: MAD1, MAD3, MXI1 e MNT. Esses heterodímeros ligam-se a regiões E-boxes, recrutam histonas deacetilases (HDAC) e reprimem a expressão gênica (ADHIKARY S & EILERS, 2005). Um esquema representativo dos mecanismos de ativação e repressão por MYC é mostrado na figura 1.5.

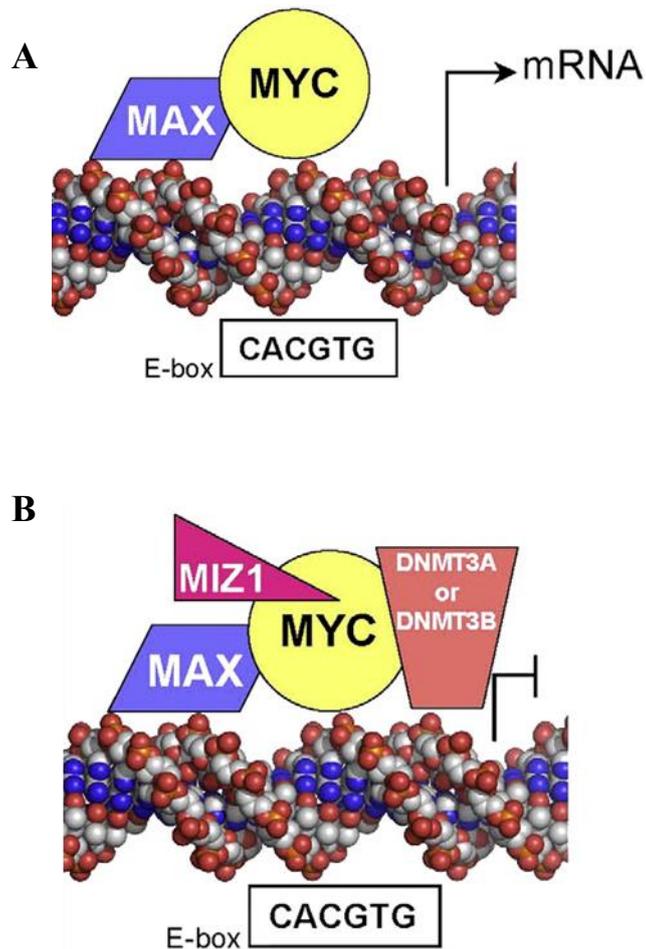


Figura 1.5: Esquema representativo dos mecanismos de regulação da transcrição gênica pelo fator de transcrição c-MYC. Em A, MYC forma heterodímero com MAX e se liga a sequências específicas (E-box) no promotor do DNA de genes alvos promovendo a síntese de RNAm. Em B, o heterodímero se liga a MIZ1, recruta as DNMT3A e DNMT3B, promovendo a metilação e repressão gênica. (Reproduzido de SMITH *et al.*, 2010).

A estabilização da proteína c-MYC é dependente da fosforilação em dois sítios no domínio N-terminal. A fosforilação da serina 62 (S62) mediada por ERK (*extracellular-regulated Kinase*) aumenta a estabilidade de c-MYC. Por outro lado, a fosforilação da treonina 58 (T58) pela GSK-3 β sinaliza a degradação de c-MYC (JUNTILA & WESTERMARCK, 2008). É importante ressaltar, que a T58 é frequentemente mutada em várias neoplasias, inclusive no LB como já mencionado. A

mutação impede que o resíduo seja fosforilado, aumentando a estabilidade da proteína (BAHRAM *et al.*, 2000). Além disso, as mutações também estão sendo associadas a uma diminuição na capacidade de ativação da apoptose por c-MYC (HEMANN *et al.*, 2005).

1.4.2 Alvos e efeitos da desregulação de c-MYC

A identificação de um único conjunto de genes regulados por c-MYC não tem sido possível, à medida que c-MYC modula a expressão uma série de genes envolvidos em múltiplos processos da biologia da célula (SEWASTIANIK *et al.*, 2014). Além disso, os estudos que avaliaram as vias oncogênicas de c-MYC em diferentes neoplasias encontraram apenas uma sobreposição parcial de vias (LIN CY *et al.*, 2012). Os genes alvos de c-MYC são predominantemente transcritos pela RNA polimerase II (Pol II). Entretanto, c-MYC também regula a transcrição de alvos da RNA polimerase I e III, aumentando os níveis de RNA ribossomal e RNA transportador. Dessa forma, c-MYC promove a proliferação celular atuando tanto na biogênese ribossomal quanto na maquinaria de tradução (ADHIKARY S & EILERS, 2005).

Uma vez que c-MYC amplifica funções celulares fundamentais no contexto das neoplasias algumas vias comumente ativadas foram identificadas em alguns tipos de tumor. A transição da fase G0/G1 a S do ciclo celular é modulada por c-MYC através da regulação da expressão das ciclinas D e E, e das cinases dependentes de ciclinas (CDK4 e CDK2), resultando na hiperfosforilação da proteína do retinoblastoma (RB1) e liberação do fator de transcrição E2F, envolvido na progressão no ciclo celular (STEINER MS *et al.*, 2000). Adicionalmente, c-MYC juntamente com E2F se liga a vários genes envolvidos na replicação do DNA, sugerindo que os dois fatores de transcrição atuam de forma coordenada (ZELLER KI *et al.*, 2006). Além disso, atua no ponto de checagem G2/M através da ativação da transcrição da ciclina B1 (DEN HOLLANDER *et al.*, 2010). c-MYC também coopera com outros fatores de transcrição como HIF1 α (fator indutor de hipóxia) e promove a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose (OSTHUS *et al.*, 2000).

A expressão de proteínas próapoptóticas também é induzida por c-MYC, como aumento da expressão de p14^{ARF} que leva a diminuição de MDM2 – uma ubiquitina ligase que degrada p53 – resultando no aumento de p53, e culminando em apoptose. Adicionalmente, c-MYC induz um aumento da proteína próapoptótica BIM e indiretamente reprime a expressão das proteínas antiapoptóticas BCL-2 e BCL-XL (EGLE A *et al.*, 2004). Desse modo, a superexpressão de c-MYC somente, não é suficiente para promover a tumorigênese. Nas neoplasias linfóides com aumento de expressão de c-MYC também são observados outros eventos como mutação na via de p53, aumento dos níveis de proteínas antiapoptóticas e aumento das vias que levam ao escape da apoptose aumentando a sobrevivência celular (LOVE C *et al.*, 2012).

Além do controle de um amplo número de genes, c-MYC também se liga em sequências regulatórias de DNA e modula a expressão de RNAs não-codificantes como os microRNAs (miRNAs). c-MYC reprime múltiplos miRNAs classificados como supressores tumorais tais como, miR-15a, miR16, a família let7, miR-34, miR-26, miR-29, miR-150 e miR-195/miR-497 (CALIN GA, *et al.*, 2002; CHANG TC, *et al.*, 2008). Embora, mecanismo pelo qual c-MYC reprime os miRNAs não tenha sido totalmente elucidado, alguns estudos recentes têm mostrado que o papel de MYC é dependente do recrutamento de enzimas modificadoras de histonas. No linfoma de células do manto (LCM) foi descrito que MYC recruta a histona deacetilase 3 (HDAC3) juntamente com EZH2 e promove a diminuição da expressão do miR-29 (ZHANG X *et al.*, 2012).

Por outro lado, a superexpressão de MYC também promove o aumento da expressão de vários miRNAs com características oncogênicas, que são denominados (“oncomiRs”), dentre eles, está incluído o *cluster miR-17-92* que contribui no aumento da proliferação celular, angiogênese, metástase, sobrevivência e metabolismo (XIONG L, *et al.*, 2013; PSATHAS & TIKHONENKO, 2014). Dessa forma, a descoberta do envolvimento de c-MYC na regulação de miRNAs aumentou ainda mais a complexidade em relação aos alvos de MYC uma vez que cada miRNA pode atuar na regulação de várias proteínas como será descrito a seguir.

1.5 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs constituídos de 19 a 24 nucleotídeos que não codificam proteínas e atuam na regulação da expressão gênica, no nível pós-transcricional. Constituem um dos mecanismos epigenéticos, além da metilação do DNA e das modificações em histonas. Atualmente, esses mecanismos são designados para representar alterações na expressão gênica herdáveis durante o processo de divisão celular e que não modificam a sequência de DNA, logo, tratam-se de alterações totalmente reversíveis (SARKIES & SALE, 2012).

1.5.1 Histórico, biogênese e função

O primeiro miRNA, *lin-4*, foi descrito inicialmente em *Caenorhabditis elegans* em 1993 (LEE RC, *et al.*, 1993). No entanto, somente após alguns anos e em seguida à descoberta do segundo miRNA, o *let-7* - também em *C. elegans* - que a sua importância e função na regulação da expressão gênica começou a emergir (OLSEN PH & AMBROS V, 1999). Até o presente momento, já foram descritos 1.881 precursores e 2.588 miRNA maduros (<http://www.mirbase.org>). No entanto, a maioria com função desconhecida.

A transcrição dos miRNAs é realizada pela RNA-polimerase II (RNA Pol II), embora haja casos de polimerase III. Os miRNAs são inicialmente transcritos como um longo precursor nuclear de tamanho variável (centenas ou milhares de nucleotídeos), ou como *clusters* de miRNAs. Estes transcritos recebem o “Cap” na extremidade 5’ e uma cauda de poliadenilato na sua extremidade 3’ e são denominados de pri-miRNA (primário miRNA) e funcionam como pri-miRNA. No núcleo, um complexo microprocessador contendo a enzima RNase III, Drosha, juntamente com seu cofator essencial DGCR8/Pasha, cliva o longo transcrito primário (pri-miRNA) e dá origem a uma molécula com estrutura secundária em forma de grampo que apresenta em torno de 70 a 100 nucleotídeos, denominada pre-miRNA, que é exportada para o citoplasma pela Exportina 5 de maneira dependente de Ran-GTP. Uma vez no citoplasma, a fita dupla do pre-miRNA é clivada pela Dicer, uma endonuclease RNase III, para formar um pequeno miRNA – miRNA* duplex – que é em seguida desenrolada pela helicase em uma única

fita madura de miRNA com cerca de 22 nucleotídeos (MACFARLANE, LA & MURPHY PR, 2010). O miRNA maduro é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e, então, este complexo liga-se a sequências complementares na região 3'UTR do gene alvo, resultando na degradação do RNAm alvo, caso seja totalmente complementar, ou na inibição da sua tradução, quando não há complementariedade total (Figura 1.5) (FABIAN MR *et al.*, 2010). Apenas umas das fitas do miRNA* duplex que se liga ao complexo RISC, a fita marcada com (*) geralmente sofre degradação (ZAMORE & HALEY 2005).

Os miRNAs são transcritos de genes individuais contendo os seus próprios promotores, embora, também são observados nas regiões de éxons e íntrons, podendo compartilhar o promotor do gene hospedeiro (MARUYAMA R & SUZUKI H, 2012). No entanto, os genes de miRNAs que estão localizados em regiões de *splicing* necessitam da maquinaria de *splicing* para que ocorra o seu processamento (BEREZIKOV E, 2011). Já os miRNAs que estão localizados em íntrons de genes codificantes de proteínas são produzidos em pequenos grampos chamados miRtrons. Os miRtrons constituem 5-10% dos genes de miRNAs em invertebrados e vertebrados e são expressos em menores níveis que o miRNAs transcritos pela via canônica descrita anteriormente (OKAMURA *et al.*, 2008).

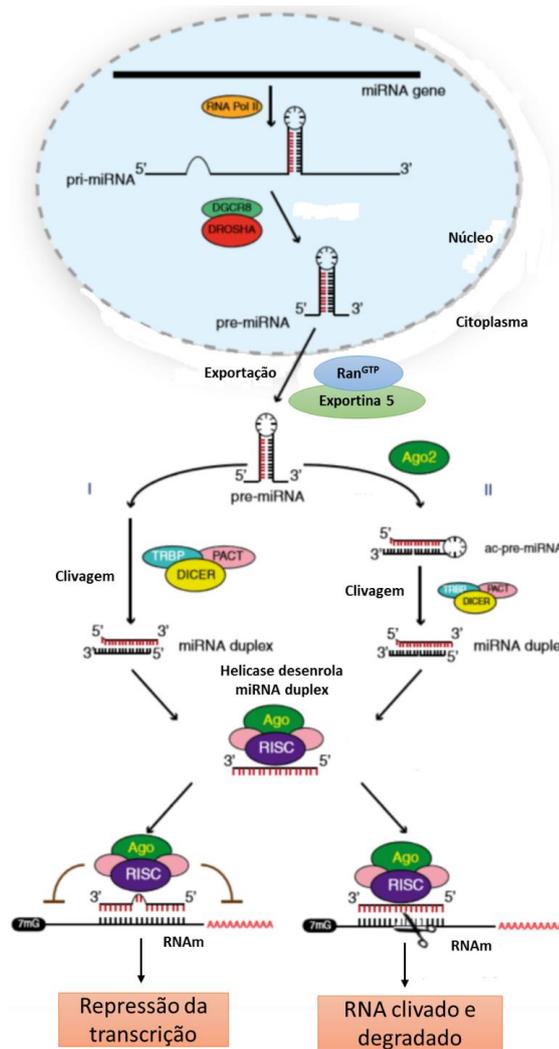


Figura 1.6: Biogênese dos miRNAs pela via canônica. Os miRNAs são transcritos a partir da RNA polimerase II em longos transcritos primários que são posteriormente clivados pela RNase Drosha juntamente com o cofator DGCR8, formando o miRNA precursor. O miRNA precursor é exportado para o citoplasma pela Exportina-5 e Ran^{GTP}, processado pela RNase Dicer, formando um complexo com as proteínas de ligação ao RNA, PACT e TRBP, em sequência ocorre clivagem gerando miRNA duplex (I). Em alguns casos, primeiro ocorre uma clivagem pela AGO2 gerando o ac-pre-miRNA; (II). Helicase desenrola o miRNA duplex e apenas uma das fitas do miRNA maduro é incorporado ao complexo RISC, que dependendo do grau de complementaridade com o RNAm alvo induz a sua degradação ou inibe a tradução. RNA Pol II, RNA polimerase II; DGCR8, *DiGeorge syndrome critical region gene-8*; exportina-5; TRBP, proteína de ligação à TAR; PACT, proteína cinase ativadora RNA; RISC, complexo de silenciamento induzido por RNA; AGO, Argonauta. Adaptado de Adams *et al.*, 2014.

A eficiência pela qual a Drosha realiza o processamento dos miRNAs é essencial para a manutenção dos níveis de miRNA na célula. Existem vários mecanismos para regular a atividade e especificidade da Drosha, sendo o mais conhecido, a estabilização através da interação proteína-proteína entre Drosha e DGCR8 (HAN *et al.*, 2009). Drosha é uma proteína de aproximadamente 160 kDa de localização nuclear, que pertence a uma família de endonucleases tipo RNase III e atuam especificamente em RNA de fita dupla (dsRNA). O domínio c-terminal possui a atividade enzimática, sendo necessário para o processamento do pri-miRNA *in vitro*, já o domínio amino-terminal é importante para a localização nuclear em células de mamíferos (HAN *et al.*, 2004). Além disso, Drosha é uma proteína essencial para o desenvolvimento, pois um estudo observou que a ausência de expressão da Drosha em células germinativas é letal durante a embriogênese de ratos reforçando desse modo, o papel dos miRNAs no desenvolvimento (CHONG *et al.*, 2010).

Alterações pós traducionais também estão envolvidas na regulação da atividade do microprocessador, alterando a biogênese dos miRNAs. Neste contexto, foram observados que a fosforilação da Drosha pela glicogênio sintase cinase 3 β (GSK3 β) é requerida para a localização nuclear da proteína (TANG *et al.*, 2011) como também a acetilação da Drosha promove sua estabilização, inibindo a degradação da mesma (TANG *et al.*, 2013). Adicionalmente, mutações em Drosha têm sido reportadas no favorecimento do Tumor de Wilms, neoplasia renal mais comum na infância (RAKHEJA *et al.*, 2014; WALZ *et al.*, 2015). No entanto, a estrutura e regulação da Drosha ainda não está totalmente elucidada, portanto, o avanço nesta área irá promover um melhor entendimento do processo de maturação dos miRNAs.

Uma vez que a ligação entre os miRNAs e RNAm é frequentemente alcançada com complementaridade imperfeita, cada miRNA pode ligar-se e regular vários RNAm (ADAMS BD, *et al.*, 2014). Mais de 5300 genes humanos são regulados através de miRNAs, representando cerca de 30% do total de genes e mais de 60% dos genes codificantes de proteínas são alvos de miRNAs (ASSLABER D, *et al.*, 2010). Por conseguinte, a expressão aberrante de um único miRNA pode alterar a tradução de múltiplos genes dentro de uma célula, ocasionando intensas alterações fenotípicas. Desse modo, os miRNAs regulam praticamente todos os processos celulares incluindo o ciclo celular, a proliferação celular, apoptose, diferenciação celular, metabolismo,

desenvolvimento de órgãos e hematopoiese (KIM VN, 2005; LAWRIE CH, 2013). Neste contexto, um grande esforço tem sido feito para esclarecer o seu papel na hematopoiese normal e maligna. Em particular, estudos sobre a expressão total de miRNA (miRome) demonstraram que a expressão dos miRNAs é um processo dinâmico durante a maturação linfóide, variando de acordo com tecidos específicos e o estágio de desenvolvimento da célula linfóide (LAWRIE CH, 2013).

1.5.2 miRNA na maturação linfóide B

A expressão gênica durante o desenvolvimento dos linfócitos é regulada principalmente por fatores de transcrição, no entanto, um nível adicional de regulação tem sido demonstrado via miRNAs (TULLIO GD, *et al.*, 2014). Para avaliar globalmente a importância do controle de miRNA no desenvolvimento de células B têm sido utilizados modelos nocautes para Dicer em progenitores de células B (KORALOV SB, *et al.*, 2008). Com estes modelos, foi possível observar que a supressão condicional de Dicer em progenitores precoces de células B induziu um bloqueio quase completo da transição pró-pré-B, sendo detectado um número muito reduzido de células B na medula óssea e nos órgãos linfóides periféricos. Este bloqueio no desenvolvimento de células B é causado por uma forte indução de apoptose em células pró-B mediadas por um aumento significativo da expressão de BIM, uma proteína pró-apoptótica (LAWRIE CH, 2013). BIM é alvo de diferentes membros do *cluster* miR-17-92 (também conhecido como Oncomir-1). Este *cluster* contém vários miRNAs individuais, frequentemente amplificados e expressos em linfomas e vários tumores sólidos (CHEN CZ *et al.*, 2004). Mais detalhes sobre esse *cluster* serão descritos no tópico a seguir. Em particular, após a exclusão de Dicer, miR-17-92 é indetectável em ambas as células, pró e pré B (LAWRIE CH, 2013). Esta observação reforça que os efeitos da deleção da Dicer dependem principalmente da perda do *cluster* miR-17-92.

Várias famílias de miRNAs têm sido descritas atuando no controle e no desenvolvimento de células-B. Numerosos estudos têm documentado que perfis específicos de expressão de miRNAs podem ser ligados a diferentes etapas do processo de maturação/diferenciação da célula B (MERKEROVA M *et al.*, 2008; HAVELANGE

V *et al.*, 2010; LAWRIE CH, 2013). No entanto, a etapa mais importante é durante a transição de pro-B para pré-B, regulada principalmente por quatro miRNAs: miR-181, miR-150, *cluster* miR-17-92, e miR-34a. Estes miRNAs controlam um número relativamente limitado de alvos em sua maioria envolvidos na morte celular, sobrevivência e proliferação celular (HAVELANGE V *et al.*, 2010).

O processo de diferenciação terminal em células plasmáticas e células B de memória também envolve a regulação por miRNAs, induzindo diminuição dos níveis do miR-9 e let-7 e aumentando miR-30 (LIN J *et al.*, 2011). Este processo resulta no aumento da expressão de PRDM1 (PR domínio contendo proteína 1), também conhecido como Blimp-1, e diminuição de BCL-6 (*B-cell lymphoma*) (NIE, K *et al.*, 2008). Portanto, o equilíbrio entre BCL-6 e PRDM1 regulados pelo miR-9 e let-7, bem como, o miR-30 representa um mecanismo de regulação importante de diferenciação de células B. A desregulação desse mecanismo pode interferir com a sobrevivência e maturação das células B, sugerindo um papel importante desses miRNAs na patogênese de linfomas de células B. Aumento nos níveis de expressão de miR-9 e let-7 foram observados em células de linfoma de Hodgkin (NIE, K *et al.*, 2008;2010; LIN, J *et al.*, 2011). Os miRNAs envolvidos em cada etapa de diferenciação do linfócito B são mostrados na figura 1.7.

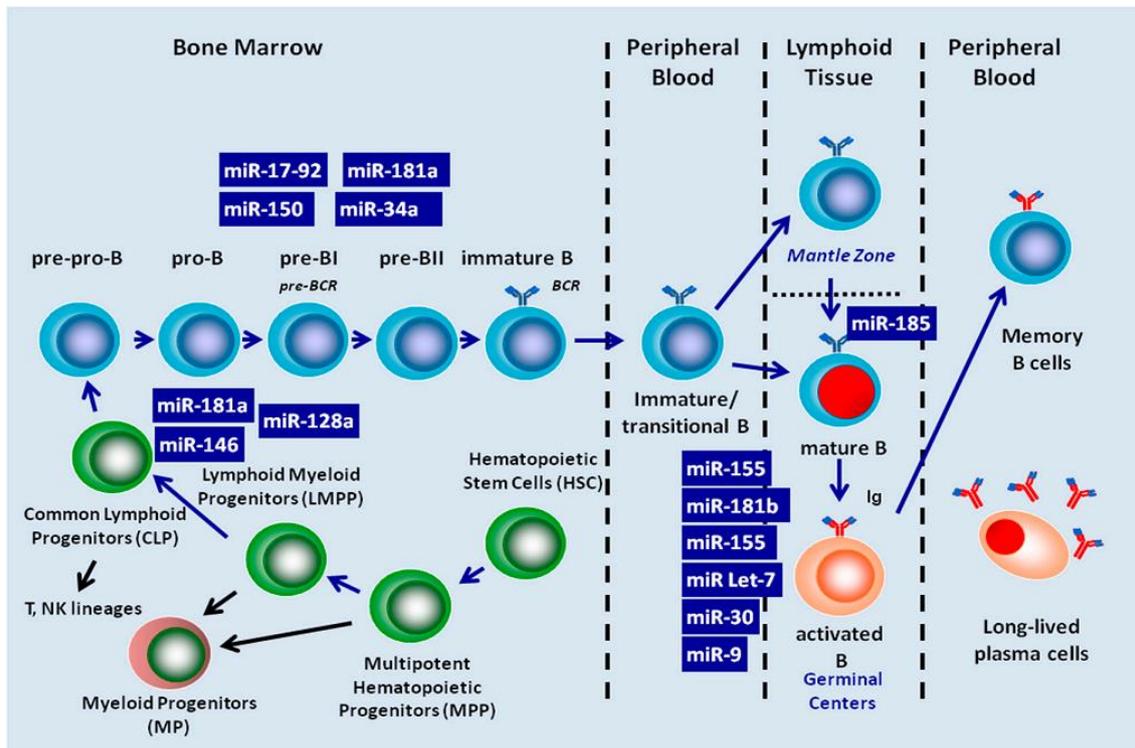


Figura 1.7: Esquema representativo dos miRNAs envolvidos na ontogenia das células B. Na ilustração gráfica são mostrados os miRNAs importantes na transição de cada etapa da célula B a partir da célula progenitora linfóide comum até diferenciação em célula B de memória e célula plasmática. (TULLIO GD *et al.*, 2014)

1.5.3 miRNAs e linfomas

Alguns miRNAs podem induzir a expressão de genes que promovem a proliferação e sobrevivência celular, bem como inibir a expressão de genes que controlam a morte celular. Assim, estes miRNAs são considerados oncogênicos e também chamados de "oncomiRs" sendo geralmente expressos em baixos níveis em condições fisiológicas. Por outro lado, o aumento da sua expressão induz a superexpressão de genes que promovem o crescimento celular e/ou diminui a expressão de genes supressores de tumor e/ou genes que controlam a apoptose, contribuindo para a tumorigênese (ZHANG *et al.*, 2007). À ressaltar, a maioria dos genes de miRNAs humanos estão localizados em regiões cromossômicas frequentemente correlacionadas ao câncer, chamadas de regiões genômicas associadas ao câncer (CAGRs). Nessas regiões é frequente a perda de

heterozigossidade, detecção de ampliações gênicas ou pontos de quebra comuns (CALIN *et al.*, 2004).

A primeira evidência experimental que mostrou o envolvimento de miRNAs no desenvolvimento do câncer surgiu a partir da identificação da deleção da região 13q14 em leucemia linfocítica crônica. Essa região abriga os miR-15a e miR-16a, e na maioria das amostras de pacientes estes miRNAs não estavam expressos, ou se encontravam com expressão diminuída (CALIN *et al.*, 2002). Desde então, outros estudos têm demonstrado o envolvimento de diversos miRNAs em diferentes modelos tumorais (SAND *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013). Nos linfomas, incluindo o LB, o miR-155 e o *cluster miR-17-92* que são classificados como oncomiRs apresentam-se expressos de forma aumentada quando comparados a células normais (EIS *et al.*, 2005, METZLER M *et al.*, 2004). Além disso, há um conjunto de miRNAs que fisiologicamente regulam genes supressores de tumor e impedem o desenvolvimento tumoral. A expressão diminuída desses miRNAs pode estar relacionada com a ocorrência de tumores uma vez que podem induzir um crescimento anormal de células, bem como à perda da função de apoptose. Alguns desses miRNAs denominados supressores tumorais foram identificados desregulados em linfomas como o miR-let7, miR-15a, miR-16-1, miR-181, miR-34a, miR-150, miR-30 e miR-29 (TULLIO GD *et al.*, 2014). A tabela a seguir descreve os principais miRNA descritos até o momento no LB.

Adicionalmente, alguns miRNAs atuam diretamente na regulação epigenética, sendo chamados de epi-miRNA. A família miR-29 foi o primeiro epi-miRNA identificado e tem como alvo a enzima DNA metil transferase (DNMT) (FABBRI *et al.*, 2007). Além disso, essa família também é regulada por mecanismos epigenéticos mediados por c-MYC (ZHANG *et al.*, 2012). Recentemente, descrevemos que a expressão dessa família de miRNAs (miR-29a/b/c) encontra-se baixa no LB pediátrico. No mesmo estudo, observamos uma expressão aumentada das DNMTs em amostras tumorais de LB, sugerindo que a família miR-29 exerce um papel da patogênese do LB (ROBAINA *et al.*, 2015). ANEXO 10.2

Tabela 1.2: miRNAs alterados no Linfoma de Burkitt

miRNA	Status	Alvo	Referência
Família let-7	-	PRDM1/blimp1, Ciclina D2, CDK6	Sampson VB <i>et al</i> , 2007
miR-9	+	e-caderina	Onnis <i>et al</i> , 2010
miR-17-92	+	BIM, PTEN, E2F1, p21	Robertus <i>et al</i> , 2010; Bueno <i>et al</i> , 2011; Di Lisio <i>et al</i> , 2012
miR-29	-	TP53, TCL1, DNMT	Robertus <i>et al</i> , 2010; Bueno <i>et al</i> , 2011; Di Lisio <i>et al</i> , 2012; Robaina MC <i>et al</i> , 2015
miR-34b	-	BCL2, SIRT1, c-MYC	Leucci <i>et al</i> , 2008
miR-150	-	c-MYB	Xiao C <i>et al</i> , 2007
miR-155	-	Lt- β	Eis PS <i>et al</i> , 2005
miR-15a/miR-16-1	-	BCL2, TP53, Ciclina D2, Ciclina E1, CDK6	Zhang X <i>et al</i> , 2012
miR-21	+	PTEN, ANP32A, SMAR-CA4	Medina PP <i>et al</i> , 2010
miR-181b	-	TCL1	Neilson JR <i>et al</i> , 2007

(+) alta expressão; (-) baixa expressão

1.5.4 Cluster *miR-17-92*

Muitos miRNAs não são encontrados no genoma como genes individuais mas sim como *cluster* de múltiplos miRNAs (ALTUVIA S *et al.*, 2005). Normalmente esses *clusters* apresentam de dois a três miRNAs, mas alguns tem vários miRNAs como o *cluster miR-17-92*, que possui seis miRNAs maduros distintos (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, e miR-92a) (YU J, *et al*, 2006). Esses miRNAs formam um policistrônico, ou seja, são transcritos como pri-microRNA individuais e em sequência

processados separadamente, formando um miRNA maduro individual. O *cluster miR-17-92* está localizado no terceiro intron do gene *C13orf25* (Chromosome 13 open reading frame 25) localizado no cromossomo 13q31–q32. (Figura 1.8). Todos os miRNAs estão localizados bem próximos, em um total de 800 pares de bases (YU J, *et al*, 2006). Dessa forma, é possível que todos sejam expressos em níveis semelhantes.

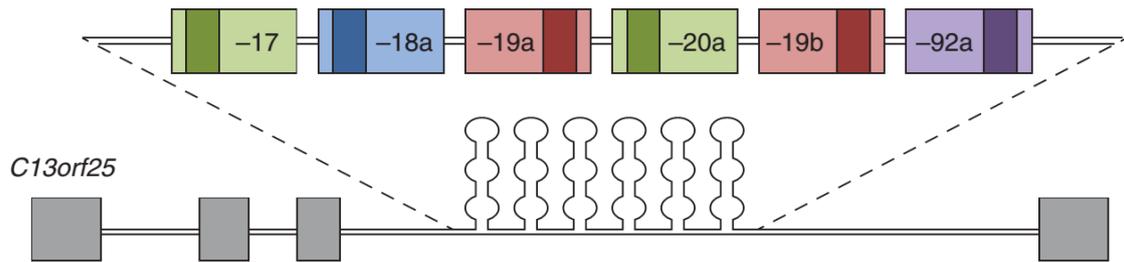


Figura 1.8: Representação esquemática do gene *C13orf25* e do *cluster miR-17-92*. A região escura de cada miRNA representa o miRNA maduro. (Adaptado de PSATHAS & TIKHONENKO, 2014).

Atualmente tem sido relatado que a expressão dos miR-17-92 encontra-se elevada em vários tipos de linfomas, como LB, LDGC-B, linfoma folicular, linfoma de células do manto e tumores sólidos, como câncer de mama, pulmão, colon, estômago, pâncreas e próstata (HE L, *et al*, 2005; OTA A, *et al*, 2004; TAGAWA H, *et al*, 2005; VOLINIA S *et al*, 2006). A primeira evidência do envolvimento dos miR-17-92 na oncogênese foi através da sua superexpressão em camundongos *E μ -Myc* - que superexpressam MYC - onde se observou uma aceleração do desenvolvimento de tumor de células B, sugerindo que os microRNAs do *cluster miR-17-92* cooperem com MYC na linfomagenese (HE L, *et al*, 2005).

A expressão do miR-17-92 é ativada através da ligação de c-MYC na região E-box localizada no primeiro íntron do gene (O'DONNELL, *et al*, 2005). Adicionalmente, o fator de transcrição E2F1 pode se ligar à região promotora e ativar a expressão do *cluster* (WOODS K *et al*, 2007; SYLVESTRE *et al*, 2007). A família de fatores de transcrição

E2F que regulam a progressão do ciclo celular também é alvo de *miR-17* e *miR-20a* (O'DONNELL *et al.*, 2005; SYLVESTRE *et al.*, 2007). Sendo assim, os membros da família E2F estimulam a expressão do *miR-17-92* e *miR-17* e *miR-20a* e inibem E2F1, criando um *loop* regulatório negativo (WOODS JM *et al.*, 2007; SYLVESTRE *et al.*, 2007). Portanto, MYC e E2F1 estimulam (*miR-17* e *miR-20*) e reprimem *miR-34a* que também tem E2F1 como alvo (PSATHAS & TIKHONENKO, 2014). O efeito cumulativo dessas relações na progressão do ciclo celular pode ser dependente do contexto e requer uma maior exploração. Entretanto, em geral, MYC reprime miRNAs que impedem a progressão do ciclo celular e induz miRNAs que visam inibir a morte celular.

O efeito oncogênico do *miR-17-92* tem sido associado em linfomas à desregulação de PTEN e BIM, duas proteínas supressores tumorais com atividade antiproliferativa e pró-apoptótica, respectivamente, importantes no desenvolvimento do linfócito B (OLIVE V *et al.*, 2009). A expressão de BIM é diminuída durante o desenvolvimento normal do linfócito B, impedindo a apoptose da célula B (VENTURA *et al.*, 2008). No entanto, em camundongos adultos, a expressão constitutiva do *miR-17-92* levou o surgimento de doenças linfoproliferativas. Além disso, a deleção de apenas um alelo de BIM e de PTEN simulou os efeitos do *cluster miR-17-92* (XIAO C *et al.*, 2008). Um esquema representativo dos alvos regulados pelo *cluster miR-17-92* é mostrado na figura a seguir.

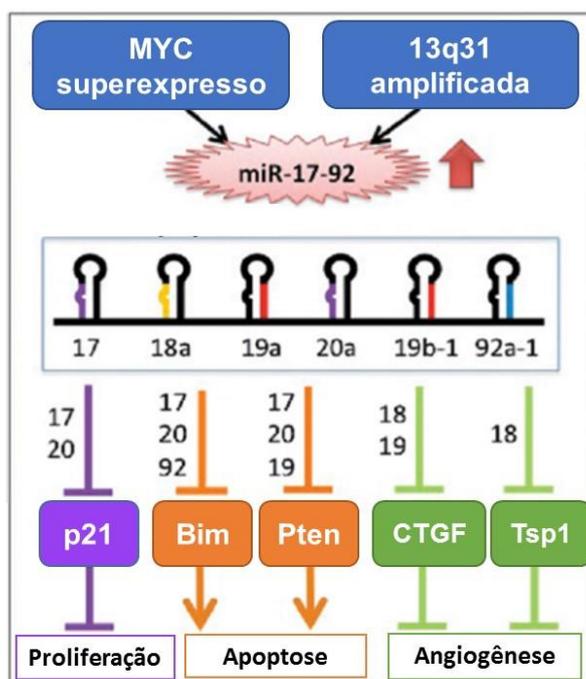


Figura 1.9: Esquema representativo dos alvos regulados pelo *cluster miR-17-92* e as vias envolvidas. A superexpressão de c-MYC ou a amplificação da região cromossômica 13q31 pode induzir um aumento na expressão dos seis membros do *cluster miR-17-92*. Dependendo do miRNA expresso, o *cluster miR-17-92* pode induzir proliferação celular, através da inibição de p21, inibição da apoptose pela inibição de Bim e/ou Pten ou aumento de angiogênese através da inibição do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) e/ou trombospondina 1 (Tsp 1).

1.5.5 A família miR-34

A família miR-34 é composta por três membros, miR-34a, miR-34b e miR-34c que são transcritos por dois genes localizados em cromossomos diferentes. O miR-34a é transcrito a partir de um gene próprio e o miR-34b/c a partir de um mesmo gene, como mostrado na figura 1.9 (HERMEKING H, 2010). Em camundongos, o miR-34a é expresso em altos níveis no cérebro, enquanto que os miR-34a/b são mais expressos no pulmão. No entanto, com exceção do pulmão, o miR-34a é mais expresso que os miR-34a/b (BOMMER GT, *et al.*, 2007; LODYGIN D, *et al.*, 2008). No entanto, ambos os membros da família 34 são alvos de transcrição da proteína p53. Sendo assim, a família

miR-34 atua na via de p53, promovendo inibição da proliferação celular e indução de apoptose (MISSO G *et al.*, 2014).

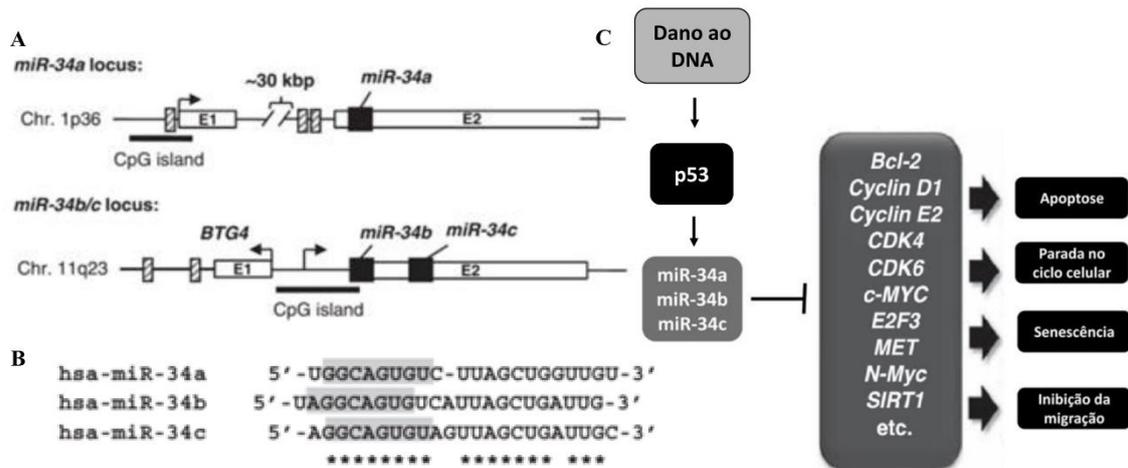


Figura 1.10: Representação esquemática dos membros da família miR-34. Em A, gene do miR-34a e miR-34b/c. Os quadrados pretos representam os *hairpins* de miRNAs e os brancos os éxons. Os retângulos tracejados representam os sítios de ligação à proteína p53. Em B, sequência de nucleotídeos da família miR-34. A nucleotídeos destacados representam a região *SEED*, sequência que se liga ao RNAm alvo; * representam bases semelhantes. Em C, via de ativação da família miR-34 com os principais alvos e eventos associados. (Adaptado de HERMEKING H, 2010).

Vários trabalhos têm demonstrado alterações da família miR-34 em diferentes tipos de tumor, evidenciando a importância dessa família na oncogênese. Em neuroblastoma, por exemplo, foi relatado 30% de deleção de miR-34a (COLE KA *et al.*, 2008). Já os miR-34b/c foram observados silenciados geralmente por metilação do DNA em tumores de ovário, pulmão, colon, mama e no LDGC-B (LUJAMBIO A *et al.*, 2008; LODYGIN D *et al.*, 2008; ASMAR F, *et al.*, 2014). Adicionalmente, modelos experimentais de carcinoma de fígado também mostraram diminuição da expressão de miR-34a. Dessa forma, a inativação da família miR-34 é um evento comum na tumorigênese.

Atualmente, vários estudos têm relatado o papel da família miR-34 em malignidades linfoproliferativas. Na leucemia linfocítica crônica, baixos níveis de miR-

34a foram correlacionados com mutação em *TP53* ou deleção 17p e essas alterações tiveram um impacto negativo no prognóstico (ASSLABER D *et al.*, 2010). Além disso, no mieloma múltiplo também foi detectada baixa expressão de miR-34b/c devido a metilação do promotor sendo mais frequente nos casos que apresentavam recaída (WONG KY *et al.*, 2011). Mais recentemente foi caracterizado um grupo de pacientes com LDGC-B que apresentavam mutação em *TP53* e metilação em miR34-a com desfecho clínico desfavorável (ASMAR F, *et al.*, 2014). Em relação ao LB, não há informações a respeito do impacto desta família no prognóstico dos pacientes. No entanto em um estudo foi observado menor expressão do miR-34b em pacientes com ausência da translocação envolvendo MYC (n=5) em relação aos pacientes com a translocação (n=10) (LEUCCI *et al.*, 2008). No entanto, estudos recentes não observaram diferença na expressão do miR-34 em relação a translocação de MYC. (LENZE *et al.*, 2011; SALAVERRIA *et al.*, 2015).

A família miR-34 inibe a progressão do ciclo celular no ponto de checagem G1/S, levando a degradação do RNAm de vários proto-oncogenes que atuam na via de p16 e p53/ARF, incluindo: c-MYC, CDK6, CDK4, CCND1 e CCNE2, reguladores positivos do ciclo celular (MEYERSON & HARLOW, 1994). Importante ressaltar que o miR-34 foi mais eficiente em promover a parada do ciclo celular do que modelos nocautes para as vias citadas, sugerindo um modelo de cooperação entre as vias (PSATHAS & TIKHONENKO, 2014). Além disso, foi mostrado que o miR-34a regula os níveis de proteína E2F em células de câncer de cólon, embora um mecanismo de alvo direto ainda não tenha sido estabelecido (TAZAWA *et al.*, 2007).

A família miR-34 foi a primeira a ser descrita como ativada por p53, através da observação da indução de miR-34b/c em resposta ao dano ao DNA (CANNELL IG *et al.*, 2010). Além disso, miR-34 induz apoptose através da inativação de SITR1, uma deacetilase que inativa p53 através da deacetilação da lisina 382 (YAMAKUCHI *et al.*, 2008). Como consequência, observa-se um aumento das proteínas pró-apoptóticas ativadas por p53: NOXA e PUMA, além da redução da antipoptótica BCL-2. Adicionalmente, BCL-2 também é alvo direto de miR-34 (BOMMER *et al.*, 2007).

Além da atividade pró-apoptótica, miR-34 também tem como efeito a inibição da apoptose em alguns determinados modelos. Esse processo ocorre uma vez que MYC é um dos alvos reprimidos por miR-34 (KONG *et al.*, 2008; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2010). Desse modo, em modelos em que não há alteração na via MYC-ARF-MDM2-p53, a superexpressão do miR-34 reduz os níveis de MYC e, conseqüentemente, diminui a estabilidade de p53 (SOTILLO E *et al.*, 2011). Além disso, esses achados foram correlacionados com diminuição da sensibilidade a agentes quimioterápicos (CATUOGNO *et al.*, 2013). Dessa forma, a manipulação dos níveis de miR-34 para fins terapêuticos, deve ser avaliada dentro do contexto genético da malignidade.

A família miR-34 vem sendo bastante avaliada como terapia em diversos modelos de câncer (MISSO G *et al.*, 2014). A utilização de miméticos do miR-34a, que são miRNAs sintéticos capazes de restaurar a expressão do miRNA, tem mostrado resultados promissores em tumores sólidos tendo sido observado inibição do crescimento tumoral em modelos de câncer de pâncreas, pulmão e próstata *in vivo* (JI *et al.*, 2008; WIGGINS JF *et al.*, 2010). No campo dos linfomas foi utilizado um modelo de xeno-enxerto de LDGC-B através de injeções intravenosas de miR-34a em camundongos sendo observada uma redução de 76% no crescimento tumoral relacionada à apoptose dos linfócitos B malignos (CRAIG VJ, *et al.*, 2012). Assim, o miR-34a foi o primeiro miRNA a entrar em estudo clínico. Um estudo de fase I está sendo conduzido em pacientes com câncer de fígado metastático através da administração do MRX34, mimético do miR-34a ligado a nanopartículas lipossomais (BOUCHIE A, *et al.*, 2013).

1.6 Justificativa para o estudo

O tratamento do LB de Burkitt é considerado uma emergência oncológica uma vez que se trata de um tumor altamente agressivo que pode dobrar de tamanho em até 24 horas. O tratamento baseia-se em doses elevadas de quimioterápicos em intervalos curtos resultando em mucosite severa, toxicidade hematológica, e efeitos tardios como doenças cardíacas e infertilidade (PATTE *et al.*, 2007). Apesar da taxa alta de resposta ao tratamento (sobrevida de cerca de 80% para estágios avançados), para o grupo de pacientes resistentes, a terapia de resgate tem sido ineficaz. Diante desse panorama, são

necessários estudos que possibilitem uma terapia alvo para o LB afim de reduzir a toxicidade ao tratamento e consequentemente redução das comorbidades e sequelas, e principalmente aumentar a sobrevida para o grupo de pacientes de alto risco.

Neste contexto, um entendimento dos miRNAs expressos no LB mostra-se bastante promissor na elucidação de possíveis alvos terapêuticos. Adicionalmente, a utilização de drogas epigenéticas a fim de restaurar a expressão de miRNAs suprimidos epigeneticamente parece ser uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. Experimentalmente tem sido observado que a restauração da expressão de miRNAs silenciados por metilação através da utilização de agentes demetilantes é capaz de suprimir a expressão de oncogenes, levando a uma diminuição do crescimento tumoral (LUJAMBIO A *et al.*, 2008; TOYOTA M *et al.*, 2008). Além disso, a função dos miRNAs pode ser especificamente e eficientemente inibida através da utilização de oligonucleotídeos antisense modificados quimicamente. Alguns inibidores já estão em fases pré-clínicas de avaliação, evidenciando o papel promissor dos miRNAs no desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais (LI & RANA, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar o papel de *c-MYC* na regulação de microRNAs e seu envolvimento na patogênese e prognóstico do linfoma de Burkitt.

2.2 Específicos:

- Avaliar a expressão dos miRNAs regulados por *c-MYC* (miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a e da família miR-34) em amostras tumorais de LB pediátrico;
- Quantificar os níveis de RNAm de *c-MYC* em amostras tumorais de LB pediátrico e correlacionar com a presença da translocação envolvendo *c-MYC*;
- Correlacionar os níveis de miRNA do cluster 17-92 com os níveis de RNAm *c-MYC* em amostras de LB pediátrico;
- Correlacionar os níveis do miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a e miR-92a com a expressão da proteína pró-apoptótica BIM;
- Analisar o impacto dos níveis de expressão dos miRNAs (miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a e da família miR-34) no prognóstico do LB pediátrico;
- Avaliar o efeito da utilização de agente demetilante de DNA na expressão do miR-34 e de *c-MYC* em linhagens celulares de LB;
- Avaliar o efeito da estabilização protéica de *c-MYC* na expressão dos miRNAs regulados por *c-MYC* em linhagens de LB;
- Investigar o efeito da estabilização de *c-MYC* na localização subcelular da proteína Drosha;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de pacientes e controles

Foram selecionadas de forma retrospectiva amostras tumorais incluídas em parafina com diagnóstico de LB que foram registradas no Serviço de Hematologia do INCA no período de 1995 a 2011. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (Registro CEP N° 18/09) (Anexo I). Como critérios de inclusão de pacientes foram utilizadas as amostras que tiveram o diagnóstico confirmado pela patologia (L.M.M), a disponibilidade do bloco tumoral, afim de que não esgotasse o material do paciente, e RNA com boa qualidade. Só foram incluídos os pacientes com dados demográficos e de acompanhamento clínicos acessíveis, e idade inferior ou igual a 18 anos. As amostras que não tiveram o diagnóstico de LB confirmado de acordo com os critérios de classificação da Organização Mundial da Saúde (JAFFE *et al.*, 2009) foram excluídas do estudo, assim como, as que não apresentavam os critérios de inclusão. Desse modo, 57 pacientes foram elegíveis para o estudo. Todos os pacientes elegíveis receberam o mesmo esquema de tratamento quimioterápico baseado no protocolo NHL-BFM 86/90 (Berlin-Frankfurt-Munster), (KLUMB *et al.*, 2004).

Como amostra referência das análises de expressão de miRNA e RNAm foram utilizados cortes histológicos de linfonodo reacional incluídos em parafina obtidos de indivíduos sem neoplasia.

3.2 Obtenção dos dados clínicos e demográficos dos pacientes

Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram obtidos através de consulta direta ao prontuário e pela utilização do sistema de dados da instituição (Intranet). O estadiamento dos pacientes foi realizado com base nos critérios de classificação de St. Jude (DIEBOLD *et al.*, 2001).

3.3 Detecção do vírus *Epstein-Barr* em amostras tumorais de LB

O *status* do vírus Epstein-Barr nas amostras tumorais já havia sido determinado por hibridização *in situ* previamente em estudos do nosso grupo (MACHADO *et al.*, 2010; ROBAINA *et al.*, 2015).

3.4 Análise da translocação envolvendo c-MYC por FISH

A presença da translocação envolvendo c-MYC foi realizada utilizando a sonda LSI MYC *Dual-Color Break-apart Rearrangement* (Vysis, Abbott, Abbott Park, IL) como descrito previamente (QUEIROGA *et al.*, 2008). Os dados foram obtidos através de uma colaboração com o Laboratório Bacchi, Consultoria em Patologia (Botucatu, SP).

3.5 Linhagens celulares

Linhagens celulares derivadas de LB endêmico (EBV+) Daudi, Raji e Namalwa e de LB esporádico BL41 e Ramos (EBV-) e a linhagem linfoblástico B, P493-6, que possui o promotor de c-MYC controlado por tetraciclina (PAJIC *et al.*, 2000) foram utilizadas no estudo. As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco), e L-glutamina (2mM). Além disso, as linhagens foram mantidas em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C, para mimetizar as condições fisiológicas. As linhagens celulares tiveram os genótipos confirmados pela técnica de STR (*short tandem repeat*) e foram testadas para micoplasma.

3.5.1 Tratamento das linhagens celulares

As linhagens (Daudi, Raji, Ramos e Namalwa) foram cultivadas na concentração de 5x10⁶ células/ml e a linhagem BL41 foi cultivada a 8x10⁶ células/ml. As células foram incubadas com 5-aza-2-deoxycytidina (5-aza-dC, decitabina, SIGMA) nas concentrações de 0,125, 0,250, 0,500 e 1,00 µM durante 24h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos, e então foi removido o meio com decitabina e foi adicionado meio sem decitabina sendo as células mantidas na estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C por mais 72h. A cada 24h era avaliado o número de células viáveis pelo corante azul de tripan, um corante vital que tem a função de diferenciar células vivas de células mortas.

As linhagens Ramos e Daudi que não apresentam mutação na treonina 58 (T58) do gene *c-MYC* (GREGORY & HANN, 2000) foram utilizadas para os experimentos com CHIR-99021 (Selleckchem), inibidor de GSK3 β , na concentração de 3 μ M durante 2, 4 e 6h.

A linhagem P493-6 foi cultivada na presença de 20 ng/ml de tetraciclina por 24h. Posteriormente, as células foram centrifugadas e lavadas três vezes com PBS e incubadas com meio sem tetraciclina a 37°C por 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. Após os tratamentos, *pellets* contendo 5x10⁶ células foram lavados três vezes com PBS e armazenados para extração de proteínas e foi adicionado 1ml de trizol para posterior extração de RNA.

3.6 Extração de RNA e miRNA de amostras tumorais de LB incluídas em parafina

As amostras tumorais utilizadas para este estudo foram obtidas a partir de blocos de parafina previamente armazenados na Divisão de Patologia (DIPAT) do Instituto Nacional de Câncer. Os blocos foram cortados com auxílio de um micrótomo produzindo cortes de 10 μ M de espessura. Para cada amostra, quatro cortes de 10 μ M foram acondicionados em tubos tipo *ependorf* estéreis e mantidos em geladeira até a sua manipulação. A fração total de RNA, incluindo miRNA e RNAm, das amostras tumorais de LB incluídas em parafina foi extraída através do *Recover AllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Ambion), segundo especificações do fabricante.

3.7 Extração de RNA de linhagens celulares

A extração do RNA total das linhagens celulares foi realizada pelo método de Trizol segundo especificações do fabricante.

3.8 Quantificação de RNA

A quantificação e o grau de pureza do RNA total extraído foram obtidos através do espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (*Thermo Scientific*). A avaliação da pureza de uma preparação de ácido nucléico pode ser avaliada através da análise da razão dos comprimentos de onda 230, 260 e 280 nm. A razão 260/280 de aproximadamente 1,8 é

aceitável, indicando pureza do ácido nucléico. Se esta razão for inferior a 1,8 possivelmente existem contaminantes que absorvem no comprimento de 280 nm, como por exemplo, proteínas e fenol. Já a razão 260/230 é uma medida secundária de pureza de ácidos nucléicos, sendo aceitável na faixa de 1,8 a 2,2. Valores inferiores indicam a presença de contaminantes, como EDTA, fenol, TRIZOL e outros compostos aromáticos. As amostras de RNA com razões inferiores a 1,8 não foram utilizadas nesse estudo.

3.9 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA das amostras tumorais incluídas em parafina e das linhagens celulares foi realizada a partir de 500 ng de RNA, através do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), baseado na utilização de *primers* randômicos para iniciar a síntese do cDNA. Este método é mais recomendado uma vez que a perda da cauda poli A do RNAm é frequente em amostras incluídas em parafina e pode dificultar o processo de síntese baseado em oligo dT (FARRAGHER *et al.*, 2008).

3.10 PCR em tempo real

3.10.1 Quantificação dos níveis de RNAm

A análise dos níveis de RNAm *c-MYC* foi realizada por PCR em Tempo Real utilizando o método de detecção *TaqMan* e quantificação relativa através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene *TBP* (*Tata box binding protein*) foi utilizado como controle endógeno e uma amostra de linfonodo reacional incluído em parafina foi utilizada como referência. Um controle negativo sem adição de DNA foi utilizado em todas as reações. As sondas *TBP* (Hs00427621_m1) e *c-MYC* (Hs00153408_m1) foram obtidas da Applied Biosystems. O volume final da reação foi de 10 μ L contendo 1X TaqMan universal Master Mix (Applied Biosystems), 1X TaqMan assay (Applied Biosystems) e 2 μ L de cDNA. As condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em duplicatas utilizando o termociclador *StepOne* (Applied Biosystems).

3.10.2 Quantificação dos níveis de microRNAs

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* e os iniciadores para RT (*reverse transcription*) fornecidos juntamente com as sondas no *Kit TaqMan® MicroRNA Assays*. Para a síntese de cDNA das amostras de pacientes, foram utilizados 10ng de miRNA. Já para as amostras de linhagens celulares que foram extraídas por Trizol, sem enriquecimento da fração de miRNA, foram utilizados 100ng de miRNA para a síntese de cDNA. Para cada alvo [hsa_miR-17 (NR_002308), hsa_miR-19a (NR_000395), hsa_miR-19b (NR_000396), hsa_miR-20a (NR_000580), hsa_miR-92a (NR_000430), hsa_miR-34a (NR_000426), hsa_miR-34b (NR_002102), hsa_miR-34c (NR_000428), e RNU6B (NR_002752)] foi realizada a síntese de um cDNA específico utilizando os iniciadores fornecidos. Os iniciadores para síntese de cDNA a partir de miRNAs apresentam uma estrutura em grampo que aumenta a especificidade da reação. Para a síntese de cDNA é feita uma reação em tubo estéril para cada alvo de acordo com as especificações do fabricante. Foi utilizado o termociclador *Peltier Thermal Cycler* (PTC-100) Bio-Rad para a reação de síntese. A reação teve início com as seguintes condições: 30 minutos a 16°C, seguido de 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85° e 4°C. Após o término da reação, a amostra foi armazenada a -20°C até a sua utilização. A análise dos níveis de miRNA foi realizada por PCR em Tempo Real utilizando o método de detecção *TaqMan* e quantificação relativa através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Todas as reações foram realizadas em duplicatas conforme descrito no item anterior.

3.11 Detecção da proteína BIM por imunistoquímica

A detecção da expressão de BIM foi realizada por imunistoquímica nas lâminas provenientes do *Tissue Microarray* (TMA). Lâminas contendo cortes do tumor coradas com hematoxilina e eosina referentes aos blocos de cada paciente foram analisadas pela patologista LMR para selecionar a região representativa em cada corte tumoral. A área do tecido selecionada foi fixada em um bloco de parafina denominado de “bloco receptor” através da utilização do *Tissue Microarrayer* (*Beecher Instruments*). O diâmetro de cada amostra incluída foi de 2,0 mm com espaçamento tanto no eixo x quanto no eixo y de 3,0mm. Em sequência, os blocos de TMA foram cortados com uma espessura de 4 µm e

aderidos a uma lâmina. As lâminas de TMA foram desparafinizadas através de três imersões em banhos de xileno P.A. (pureza mínima 99% - Vetec®) sendo a primeira imersão com duração de 5 minutos e as duas últimas de 10 minutos cada e re-hidratadas através de quatro imersões em banhos de etanol P.A. (pureza mínima 99,8% - Merck®) sendo cada imersão com duração de um minuto cada, seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos. Em sequência, as amostras foram submetidas à recuperação antigênica em Tampão Tris EDTA pH 9,0 por 20 minutos a 98 °C em *steamer* (Arno®). Após a recuperação antigênica, as amostras foram resfriadas por 10 minutos à temperatura ambiente, imersas no tampão, e depois lavadas por 5 minutos em água corrente. Após este processo, as amostras foram lavadas em Tampão Tris Salino (TBS) (0.05M Tris Base, 0,9% NaCl) pH 7.6 três vezes por 5 minutos. Para maximizar e tornar homogêneo o contato dos reagentes com as amostras, o contorno dos tecidos foi marcado com uma caneta cuja tinta hidrofóbica (PapPen – Dako®) que delimita a área de aplicação e a localização dos reagentes utilizados na técnica. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação das amostras com peróxido de hidrogênio 3% por 20 minutos. Após este processo, as amostras foram submetidas à imersão em água destilada e lavadas em TBS pH 7.6 três vezes por 5 minutos. Logo após, foi realizado um bloqueio para prevenir ligações inespecíficas através da incubação das amostras com uma solução de bloqueio contendo leite em pó desnatado a 2%, albumina sérica bovina fração V (BSA) a 2,5% e soro fetal bovino a 8% por 30 minutos. A seguir, removido o excesso da solução de bloqueio, as amostras foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-Bim 1:200 (AAP-330 - *Assay Resignin*) a 4 °C *overnight*. O anticorpo primário foi diluído em uma solução contendo azida sódica a 0,18%, BSA a 0,1% em TBS. No controle negativo, foi omitido o anticorpo primário e aplicou-se apenas a solução diluente dos anticorpos no material. Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram imersas em água destilada e lavadas em TBS pH 7.6 três vezes por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a um polímero associado à peroxidase (Envision, Dako) por uma hora. Em sequência as amostras foram imersas em água destilada e lavadas em TBS pH 7.6, três vezes por 5 minutos. Para visualização da marcação, as amostras foram incubadas com o cromógeno tetracloro 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Dako) (substrato da peroxidase, convertido por ela em um metabólito acastanhado) a 10 µL por mL de tampão diluente (1:100) por um

minuto, e lavadas em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas em Hematoxilina de Harris (HH) por 20 segundos para uma discreta contra-coloração, e lavadas em água corrente por mais 5 minutos. Por fim, as amostras foram desidratadas através de imersão em quatro banhos de etanol P.A., seguidos por quatro banhos de xileno P.A. por um minuto cada e a cada lâmina foi aderida uma lamínula com bálsamo de Damar, permitindo visualização em microscópio.

A quantificação da expressão foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. Foram considerados negativos os casos que não apresentaram expressão, ou com percentual de células tumorais positivas inferiores a 10%. Como casos positivos para expressão foram considerados aqueles que apresentaram marcação citoplasmática superior a 10%. A análise foi realizada pela médica patologista sem conhecimento das características clínicas e demográficas dos pacientes sempre acompanhada pela aluna. As imagens fotográficas foram feitas em um microscópio Nikon Eclipse E200 ligado a um sistema de digitalização *Digital Sight* conectado a um computador e as imagens foram captadas no programa NIS-Elements F 2.30.

3.12 Western Blotting

Para a análise de expressão protéica, a extração de proteínas totais foi realizada utilizando o tampão de extração Invitrogen ao pellet celular (5×10^6 células) conforme especificações do fabricante. Esses extratos protéicos foram então centrifugados a 13000 RPM por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante retirado e armazenado a -20°C. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Lowry (BIO-RAD) (LOWRY *et al.*, 1951). Foram utilizados 30µg de proteína de cada amostra e acrescentados 15 µL de tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8; SDS 2%, glicerol 10%, Azul de bromofenol 0,025% e β-mercaptoetanol 200 mM. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos antes de serem submetidas à eletroforese unidimensional segundo protocolo de SDS-PAGE de Laemmli (do inglês, sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis) (LAEMMLI UK, 1970). Este protocolo baseia-se na utilização de um gel de poliácridamida de 12%, constituído por 3,35 mL de água destilada, 2,5 mL de Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 M; 100 µL de SDS 10%; 4 mL de acrilamida/bisacrilamida (30%); 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED (gel de resolução), separando as

proteínas de acordo com o seu peso molecular. Sobre o gel de resolução, após polimerização, foi feito o gel de empilhamento (stacking gel), constituído de 6,1 mL de água destilada, 2,5 mL de Tris-HCl, pH 6,8, 0,5M; 1,3 mL da solução de acrilamida/bisacrilamida 30% e 100 µL de SDS 10%. Após completa polimerização (aproximadamente 30 minutos), foi acrescentado o tampão de eletroforese composto por Tris 0,025 M, glicina 0,0192 M, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3. As amostras foram aplicadas de maneira que sempre havia no gel um poço preenchido pelo padrão de peso molecular *Rainbow* (Amersham Biosystems/GE Healthcare). Ao término da aplicação das amostras, teve início à eletroforese das proteínas em gel a 120 V constantes por aproximadamente uma hora e trinta minutos.

Após eletroforese, as bandas protéicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ECL, (Amersham Biosciences) utilizando-se tampão contendo Tris 25 mM, Glicina 193 mM e 20 % de metanol em uma cuba de transferência úmida a 100 V por 1 hora. Após transferência, a membrana foi lavada duas vezes com TBST (Tris-HCl, pH 8,0 10 mM, NaCl 150 mM e Tween-20 0,02%). Para verificar se a transferência foi eficiente, as membranas foram coradas com Vermelho de Ponceau (Ponceau S 50mg, Ácido Acético glacial 5%, água Milli-Q q.s.p. 50 mL). Em seguida a membrana foi lavada com TBST (tampão TBS Tween) e incubada por 1h com uma solução contendo TBST e 5% de leite em pó desnatado à temperatura ambiente sob agitação leve e depois lavada em tampão TBST por 1 minuto. Em seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos específicos anti-Myc (1:200 Epitomics), anti-Bim (1:1000 C34C5, Cell Signaling) ou anti β -actina (1:3000 Sigma-Aldrich) (usada como controle constitutivo de expressão proteica basal), diluídos em TBST leite 5% overnight a 4°C. Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos cada, em TBST sob agitação leve em temperatura ambiente e incubada com os respectivos anticorpos secundários (anti mouse 1:5000; anti rabbit 1:6000) diluído em TBST 5% de leite por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação suave, e seguida de 3 lavagens de 10 minutos cada em TBST. As bandas das proteínas de interesse foram reveladas utilizando-se o Kit ECL Prime (GE Healthcare, UK) de acordo com as especificações do fabricante e as bandas foram visualizadas no C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA) ou no filme de raio-X.

3.13 Transfecção com inibidor de miR-17

A linhagem Daudi foi plaqueada em placa de 12 poços (2×10^5 células por poço) em meio opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e transfectadas com o inibidor do miR-17 (*hairpin inhibitor*, IH-300485-06, Dharmacon) ou com o controle negativo baseado na utilização do miRNA 67 de *C. elegans* (IN-001005-01, Dharmacon) sem complementariedade com alvos humanos. A transfecção foi realizada com o reagente Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Este sistema de inibição consiste na utilização de oligonucleotídeos fita simples de RNA em forma de grampo que são complementares a sequência de miRNA maduro, e por isso, inibem a função dos mesmos. Decorridos 24 e 48 horas da transfecção as células foram coletadas para análise da expressão protéica por western blotting conforme descrito anteriormente utilizando os seguintes anticorpos: anti-Bim (C34C5, Cell Signaling), anti-cMyc (9E10, Calbiochem) e anti- β -actina (A3854 Sigma).

3.14 Vetores plasmidiais

As bactérias contendo os vetores plasmidiais, GFP-Drosha e GFP-Drosha S300/302A foram cedidos pelo Dr Bharat Ramratnam (Addgene plasmid #62520 e #62530, respectivamente) (TANG *et al*, 2010). A cultura de bactérias foi plaqueada em meio LB *Broth Base* (Invitrogen) com Kanamicina (50 μ g/mL) e incubada *overnight* a 37°C. Em seguida, foram selecionadas três colônias formadas a partir de cada vetor e crescidas em 2 ml de LB líquido com Kanamicina no agitador a 37°C. Decorridas 6 horas, o DNA plasmidial foi extraído das respectivas colônias utilizando o *kit* de mini-prep (Plasmid Mini Kit, Qiagen). Os plasmídeos foram verificados através da digestão com enzimas de restrição específicas (HindIII e KpnI, New England BioLab-NEB) e corrida em gel de agarose 1% em TAE (Tris-Acetato-EDTA). Posteriormente, o DNA plasmidial foi sequenciado utilizando o primer 5'-AGGCATCGGTCCCTGGAT-3' e a sequência do gene da Drosha foi verificada através do software FinchTV. Desse modo, as bactérias contendo os plasmídeos verificados foram expandidas em meio LB contendo Kanamicina para extração dos plasmídeos por maxi-prep (PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit, Invitrogen) e utilização nos experimentos de transfecção das culturas celulares.

3.15 Transfecção celular

Os plasmídeos foram transfectados em células 293 que são células de rim provenientes de embrião humano, cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco), L-glutamina (2mM) e mantidas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37° C. As células foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção de modo que houvesse 60% de confluência no momento da transfecção. Foi utilizado tripsina-EDTA (0.5%) (Gibco) para remover as células da placa e, então, utilizadas 2x10⁶ células para transfecção. As células foram eletroporadas utilizando o programa A-023 do sistema AMAXA[®] com o reagente V (Lonza) utilizando 2 µg dos plasmídeos GFP-Drosha, GFP-Drosha S300/302A ou pmaxGFP[®] (controle positivo da técnica). A eficiência da transfecção foi avaliada por citometria de fluxo, através da quantificação do percentual de células GFP positivas transfectadas com o vetor pmaxGFP[®].

3.16 Microscopia confocal

A localização da proteína Drosha nas linhagens não transfectadas foi realizada pela técnica de imunofluorescência. Foram lavadas 10⁴ células com o meio de cultura gelado, centrifugadas a 1200 RPM e fixadas em paraformaldeído 2% em tampão fosfato, 0,1M, pH 7,4 e sucrose, 0,03M em incubadas durante 20 minutos em gelo. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS/BSA 1% e permeabilizadas com saponina 0,5%, PBS, sucrose 0,03M e BSA 1% durante 5 minutos em temperatura ambiente e lavadas com PBS/BSA 1%. Em seguida, as células foram bloqueadas por 15 min com PBS/BSA 5%. As células foram centrifugadas e aos tubos, foram adicionados 500 µl do anticorpo anti-Drosha (1:250; ab12286, Abcam), e incubados overnight a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS/BSA 1% e incubadas com 500 µl do anticorpo secundário anti-rabbit Alexa488 (1:200; Invitrogen). Após 30 min de incubação, as células foram submetidas a três lavagens com PBS/BSA 1%, seguidas de centrifugações. Por fim, os *pellets* foram resuspendidos em 200 µl de PBS/BSA 1% e adicionados em lâminas eletricamente carregadas. Decorridos 20 minutos a solução foi aspirada e as lâminas foram aderidas a uma lâminula com meio de montagem contendo

DAPI (Vectashield; cat# H1200) e visualizadas no microscópio confocal Leica STED 3× Super Resolution Confocal System.

3.17 Fracionamento subcelular

O fracionamento subcelular foi realizado pelo kit NE-PER (NEPER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents; ThermoScientific) de acordo com as especificações do fabricante, para verificar se ocorria uma alteração na localização da Drosha mediante o tratamento com o CHIR-99021 (Selleckchem). A separação das frações nuclear e citoplasmática foi viabilizada e os níveis de Drosha foram avaliados em cada fração subcelular pela técnica de Western blotting.

3.18 Análise estatística

As comparações entre as variáveis categóricas foram realizadas através do teste de chi-quadrado ou teste exato de Fisher. As análises entre variáveis contínuas foram feitas através do teste de Mann Whitney e Kruskal-Wallis. As curvas de sobrevida foram desenvolvidas utilizando o método de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas para cada característica foi realizada através de análise univariada com o teste de Log-rank. A análise multivariada para identificar os fatores prognósticos independentes foi realizada pelo método da regressão de Cox. Foi utilizado um intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,050$. As análises foram realizadas no programa SPSS 20.0.

4 DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO

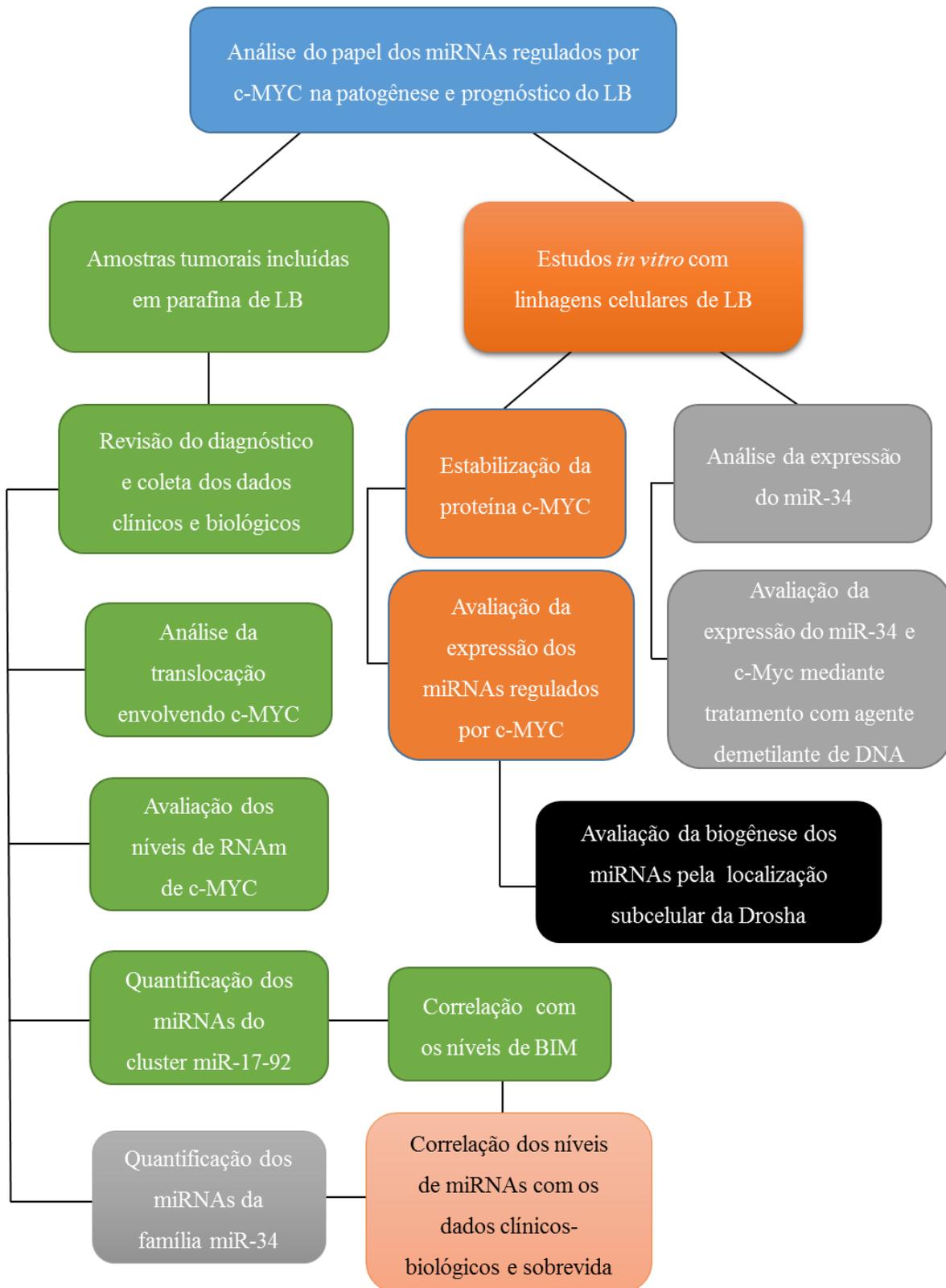


Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes com LB

Foram selecionados para o estudo 57 casos de LB esporádico, sendo que 2 (3,5%) casos foram de LB associado ao HIV. Foi observada uma maior frequência do gênero masculino, sendo 43 (75,4%) pacientes masculinos e 14 (24,6%) do gênero feminino, sendo a razão masculino/feminino igual a 3,1. Em relação à idade, a variação foi de 2 a 18 anos com mediana de 7 anos. Ao analisar a frequência de distribuição das idades dos pacientes observamos que 82,5% dos pacientes eram crianças, considerando até 12 anos incompletos, e que apenas 17,7% da população era constituída por adolescentes (12 a 18 anos).

De acordo com os critérios do estadiamento de *St Jude*, a maioria dos pacientes, ou seja, 45 de 57 (78,9%) foram diagnosticados nos estágios III/IV que representam doença avançada, e apenas 12 (21,1%) pacientes nos estágios I/II que caracterizam doença localizada. Em relação aos níveis séricos de LDH foi observada uma variação de 23 a 6.122 UI/L com média de 1.297 UI/L sendo que em 25 (45,5%) dos pacientes a LDH estava duas vezes acima do valor normal (>1000 UI/L; valor normal ≤ 500 UI/L). Dois pacientes não tiveram a LDH determinada ao diagnóstico. O EBV foi detectado em 27/54 (50%) das amostras tumorais. Não foi possível verificar associação ao EBV em 3 casos devido à baixa qualidade do tecido tumoral ou à quantidade insuficiente de amostra tumoral. Foi possível avaliar a translocação envolvendo *c-Myc* em 41 amostras, sendo 35 (85,4%) casos positivos para a translocação e em 6 casos foi observada ausência de translocação (14,6%). A tabela 5.1 mostra as frequências dos dados clínicos e demográficos observados na série de pacientes com LB. Os casos de LB sem a translocação de *c-MYC* foram reavaliados e tiveram o diagnóstico confirmado pela patologista do estudo LMR de acordo com as características imunofenotípicas e clínicas. Adicionalmente, não foi observada diferença entre as características clínicas envolvendo a presença da translocação de *c-MYC*. As características clínicas desses pacientes estão descritas nas tabelas 5.2 e 5.3.

Tabela 5.1: Características Clínicas e Biológicas dos pacientes com LB.

Característica	Número (%)
Diagnóstico	
LB esporádico	55 (96,5)
LB HIV	2 (3,5)
Gênero	
Feminino	14 (24,6)
Masculino	43 (75,4)
Idade (anos)	
Média	7,5
Mediana	6,5
Variação	2-18
Estágio	
I/II	12 (21,1)
III/IV	45 (78,9)
LDH	
>1000 UI/L	25 (45,4)
<1000 UI/L	30 (54,6)
EBV	
Positivo	27 (50)
Negativo	27 (50)
c-Myc translocado	
Presente	35 (85,4)
Ausente	6 (14,6)

LDH (lactato desidrogenase); EBV (vírus Epstein-Barr)

Tabela 5.2 Características clínicas-biológicas dos pacientes c-MYC não translocado

Paciente	Idade/Gênero	Sítio acometido	LDH (U/L)	Estágio	EBV status	Desfecho
1	11/M	Íleo	385	II	Negativo	Vivo
2	10/F	Nasofaringe	575	II	Negativo	Vivo
3	6/F	Abdômen	536	III	Negativo	Vivo
4	9/M	Cervical	315	I	Negativo	Vivo
5	4/M	Abdômen	570	III	Positivo	Vivo
6	6/F	Abdômen	1613	III	Positivo	Vivo

Tabela 5.3 Análise entre os casos positivos e negativos para translocação de c-MYC

Característica	c-Myc translocação		P valor
	Positiva	Negativa	
Estágio (St Jude)			
I/II	5	3	0.077 ¹
III/IV	30	3	
LDH			
>1000	19	1	0.184 ¹
≤1000	16	5	
EBV			
Positivo	18	2	0.395 ¹
Negativo	14	4	
Nível RNAm c-MYC			
Variação	0.22-28.66	0.66-4.39	0.241 ²
Média	6.81	2.33	
Nível miR-17			
Alto	10	0	0.307 ¹
Baixo	24	6	
Nível miR-19a			
Alto	5	0	1.000 ¹
Baixo	27	4	
Nível miR-19b			
Alto	14	0	0.141 ¹
Baixo	18	4	
Nível miR-20a			
Alto	10	0	0.168 ¹
Baixo	22	6	
Nível miR-92a			
Alto	7	1	1.000 ¹
Baixo	26	5	

LDH, lactato desidrogenase; EBV, Vírus Epstein-Barr; ¹Teste Chi Square; ²Teste Mann-Whitney.

5.2 Resposta ao tratamento dos pacientes com LB

A probabilidade de sobrevida global (SG) foi calculada durante o período de acompanhamento de 60 meses. Os dois pacientes que apresentaram LB associado ao HIV foram excluídos das análises de sobrevida devido ao desfecho clínico ser totalmente diferente dos demais pacientes. Além disso, dois casos não realizaram tratamento na instituição e não foram incluídos nas análises de sobrevida. O tempo médio de acompanhamento clínico (SG) dos 53 pacientes foi de 54,6 meses. A probabilidade de SG em cinco anos foi de 77,4% (erro padrão 3,2%) (Figura 5.1).

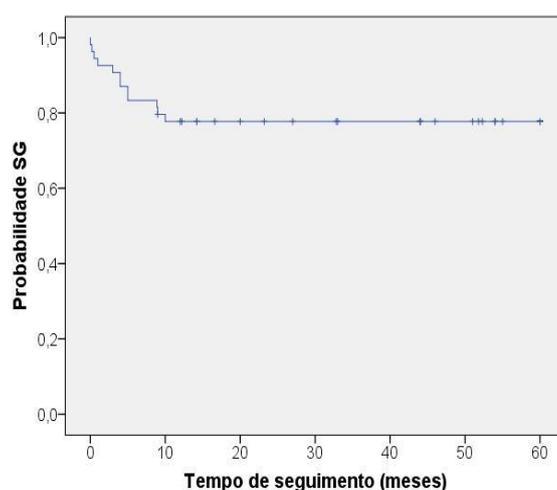


Figura 5.1: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos pacientes com LB. A sobrevida global dos 53 pacientes com LB em cinco anos. As barras verticais representam censuras por perda de seguimento.

Em seguida, foi avaliado o impacto das variáveis demográficas e clínicas na SG dos 53 pacientes com LB. Com relação ao gênero não houve diferença significativa na SG ($p=0,201$). Em relação à idade, os pacientes foram categorizados em dois grupos, tendo como ponto de corte 6 anos de idade, mas também não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,515$).

Posteriormente, foi analisado o impacto das variáveis clínicas na SG dos pacientes com LB. Em relação ao estadiamento foi observado um desfecho clínico desfavorável para os pacientes com estádios III/IV ($p=0,047$). De acordo com os níveis séricos de LDH, estratificando em dois grupos - maior e menor que 1000 UI/L - foi detectada uma

diferença significativa na SG ($p=0,002$). Já a presença do EBV no tumor não alterou a sobrevida dos pacientes de forma significativa ($p=0,096$) (Figura 5.2).

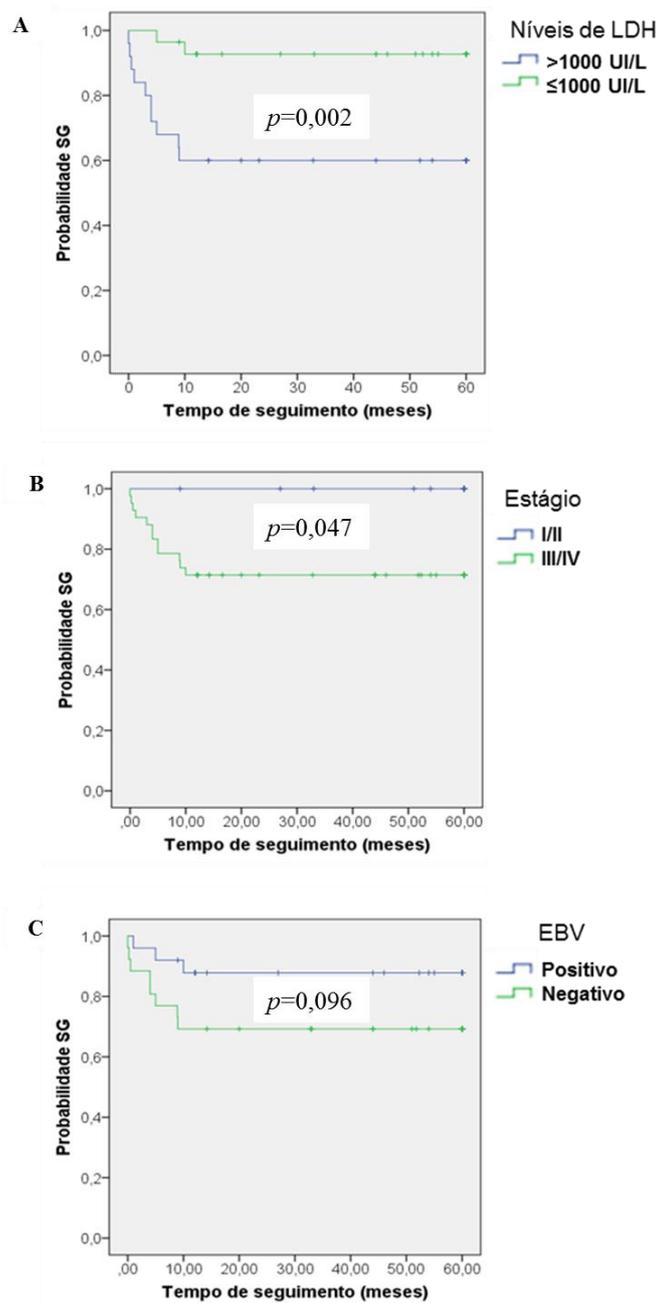


Figura 5.2: Curvas de Kaplan-Meier das sobrevidas globais em 5 anos. Em A, sobrevida global dos pacientes com LB de acordo com os níveis de LDH, maior e menor que duas vezes o valor normal. Em B, sobrevida global relacionada com os estágios I/II e III/IV. Em C, sobrevida global em relação à presença do EBV no tumor. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.3 Quantificação dos níveis de miRNAs em amostras tumorais de LB

A quantificação relativa dos níveis dos miRNAs regulados por c-MYC: mi-R17, mi-R19a, mi-R19b, miR-20a, miR-92a, miR-34a, miR-34b e miR-34c foi realizada por PCR em tempo real nas amostras tumorais de LB, normalizadas em relação ao gene *RNU6B*. Uma amostra de linfonodo reacional incluída em parafina foi utilizada como referência, conforme descrito previamente. Os valores de média, mediana, desvio padrão e variação da quantificação relativa para todos os alvos avaliados estão descritos na tabela 5.4. Com o objetivo de avaliar se havia diferença estatística entre os níveis relativos de expressão dos miRNAs que estão no mesmo gene e que são controlados pelo mesmo promotor, ou seja, entre os cinco membros, miR(-17, -19a, -19b, -20a e -92a), que fazem parte do *cluster miR-17-92* e o miR-34b e miR-34c, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney, respectivamente. Desse modo, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis dos miRNAs do *cluster 17-92* ($p=0,0006$) e entre os miRNAs da família *miR-34* ($p=0,0001$), como mostrado na figura 5.3. Posteriormente, nós avaliamos a diferença dos níveis de expressão entre pares de miRNA do mesmo *cluster* pelo teste Mann Whitney. Dessa forma, foi detectado uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis do miR-92a com cada membro do *cluster* miR-17, 19a, 19b e 20a ($p=0,0001$, $p=0,0003$, $p=0,0310$, $p=0,0043$, respectivamente). Sugerindo que o miR-92 é o membro do *cluster 17-92* menos expresso no LB pediátrico.

Tabela 5.4: Valores da quantificação relativa dos miRNAs nas amostras de LB.

	miR-17	miR-19a	miR-19b	miR-20a	miR-92a	miR-34a	miR-34b	miR-34c
Nº de amostras	56	49	49	52	52	51	55	24
Média	2,5	6,2	2,4	1,9	1	0,2	0,6	0,2
Mediana	1,3	1,4	1,2	1,1	0,5	0,1	0,3	0,03
Desvio padrão	2,7	20,9	4,3	2,1	1,2	0,3	0,7	0,3
Variação	0,15-9,7	0,04-148	0,02-28,8	0,00-11,8	0,01-4,6	0,00-1,17	0,00-3,1	0,00-0,9

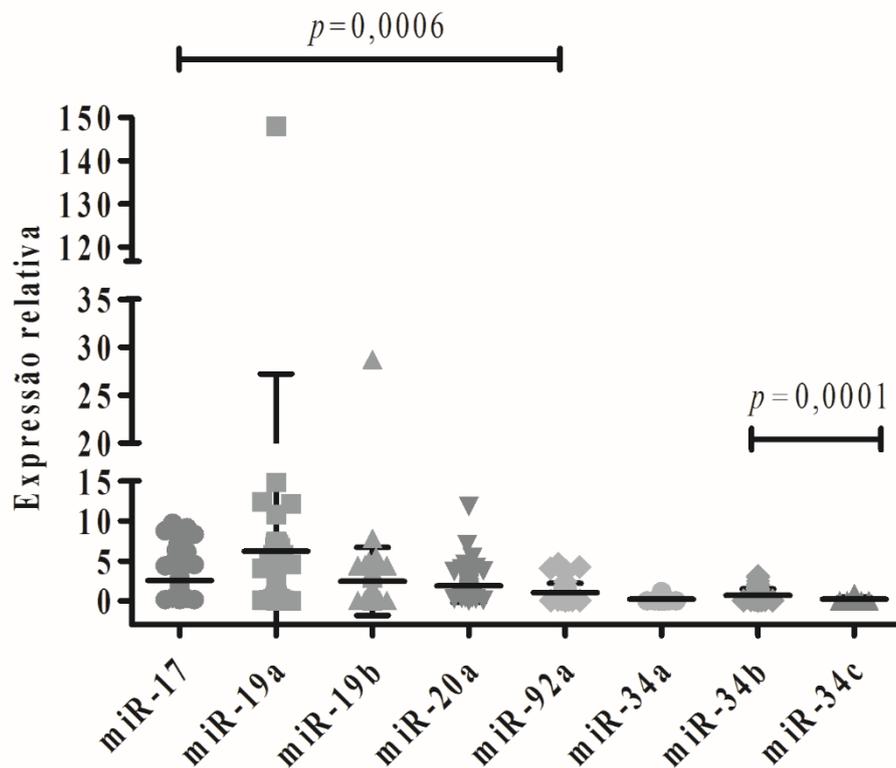


Figura 5.3: Níveis relativos de expressão de miRNAs em amostras tumorais pediátricas de LB. Avaliação entre os níveis de miRNA localizados no *cluster* miR-17-92 e miR-34(b/c). A quantificação dos miRNAs foi realizada por PCR em tempo real, utilizando uma amostra de linfonodo reacional como referência. As barras horizontais representam a média \pm desvio padrão. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Teste Kruskal-Wallis entre o *cluster* e Mann Whitney entre os miR-34b e c.

5.4 Expressão de RNAm de *c-MYC* não está correlacionada com os níveis de expressão dos miRNAs do *cluster* 17-92

Os níveis de RNAm de *c-MYC* foram quantificados por PCR em tempo real e uma amostra de linfonodo reacional incluída em parafina foi utilizada como referência. A expressão foi normalizada em relação ao controle endógeno *TBP*. Do total de 57 amostras, 41 apresentaram RNA com qualidade e quantidade suficiente para a análise. Os níveis de expressão relativa de *c-MYC* nas amostras tumorais de LB variaram de 0,22 a 28,7, com média de 5,7 e mediana de 2,6. Foi observado uma expressão menor nas amostras

tumorais de pacientes que não apresentaram a translocação envolvendo *c-MYC* em relação ao grupo de pacientes positivos para a translocação, porém, não foi detectada diferença estatisticamente significativa, provavelmente, pelo pequeno número de casos negativos (n=5) ($p=0,2380$) (Figura 5.4). Além disso, não observamos diferença nos níveis de miRNAs nas amostras tumorais dos pacientes em relação a translocação (tabela 5.3). Afim de uniformizar o número de amostras utilizadas, as próximas análises utilizarão apenas as amostras com o dado da translocação de *c-MYC* (n=41). Adicionalmente, não observamos correlação entre os níveis de RNAm de *c-MYC* e os membros do cluster miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a ($p=0,443$, $p=0,787$, $p=0,976$, $p=0,768$ e $p=0,285$, respectivamente) utilizando o coeficiente de correlação de Spearman.

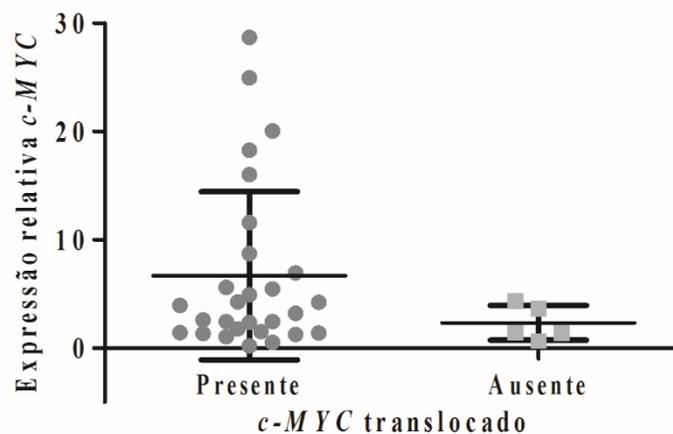


Figura 5.4: Expressão relativa do RNAm de *c-MYC* em relação a presença da translocação de *c-MYC*. Análise dos níveis de expressão do RNAm de *c-MYC* nas amostras tumorais de LB em relação à translocação de *c-MYC* ($p=0,2380$). A quantificação foi realizada por PCR em tempo real, utilizando uma amostra de linfonodo reacional como referência. As barras horizontais representam a média \pm desvio padrão. Teste Mann Whitney. $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.5 Expressão proteica de BIM não foi associada com a sobrevida dos pacientes com LB

Após as análises da expressão dos miRNAs do *cluster 17-92* em amostras tumorais de LB, fomos avaliar a expressão da proteína BIM que é o principal alvo do *cluster miR-17-92* e tem um importante papel na linfomagenese (PSATHAS & TIKHONENKO, 2014). A expressão da proteína BIM foi avaliada em 33 de 41 casos de LB por imuno-istoquímica (Figura 5.5) e a proteína foi detectada em 22 (66,7%) casos. Ausência de expressão foi observada em 11 (33,3%) das amostras tumorais de LB ao diagnóstico. Não foi observada associação da expressão de BIM com o prognóstico e SG dos pacientes com LB ($p=0,374$) (Figura 5.6). Estes dados foram obtidos previamente durante o mestrado da aluna no Programa de Pós Graduação em Oncologia.

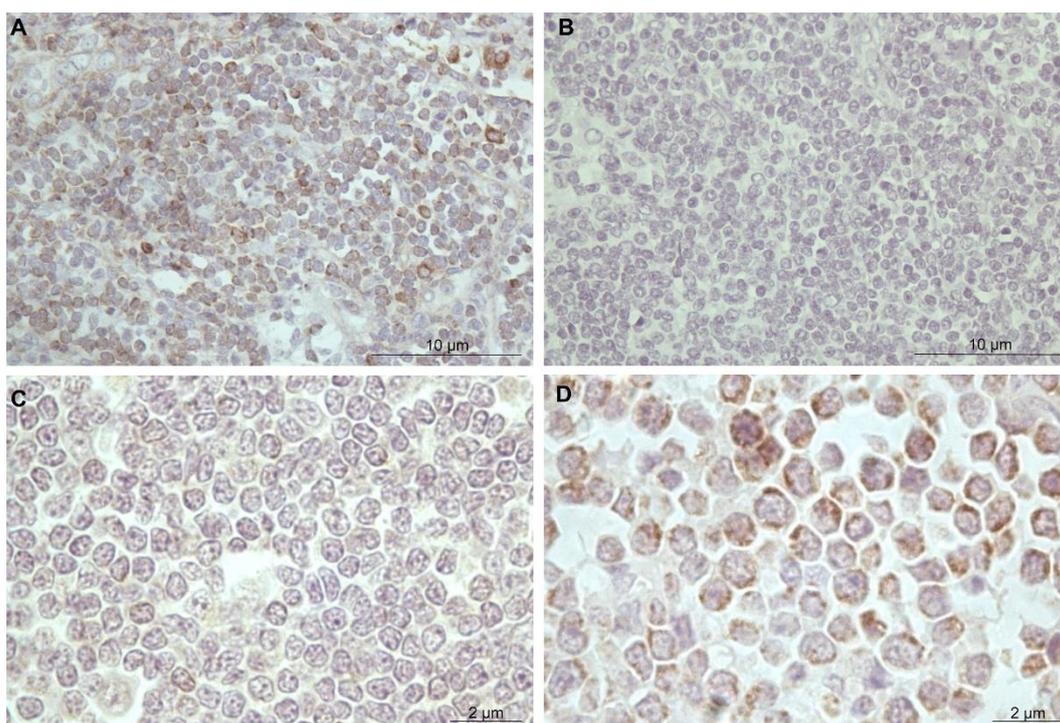


Figura 5.5 Detecção por imuno-istoquímica da expressão citoplasmática de BIM em amostras tumorais de LB. Em A, amostra de linfonodo reacional utilizada como controle positivo da reação. Em B, controle negativo da técnica, ou seja, ausência de anticorpo primário anti-Bim. Em C, representação de um caso de LB negativo para expressão de Bim. Em D, representação de um caso de LB com expressão de BIM.

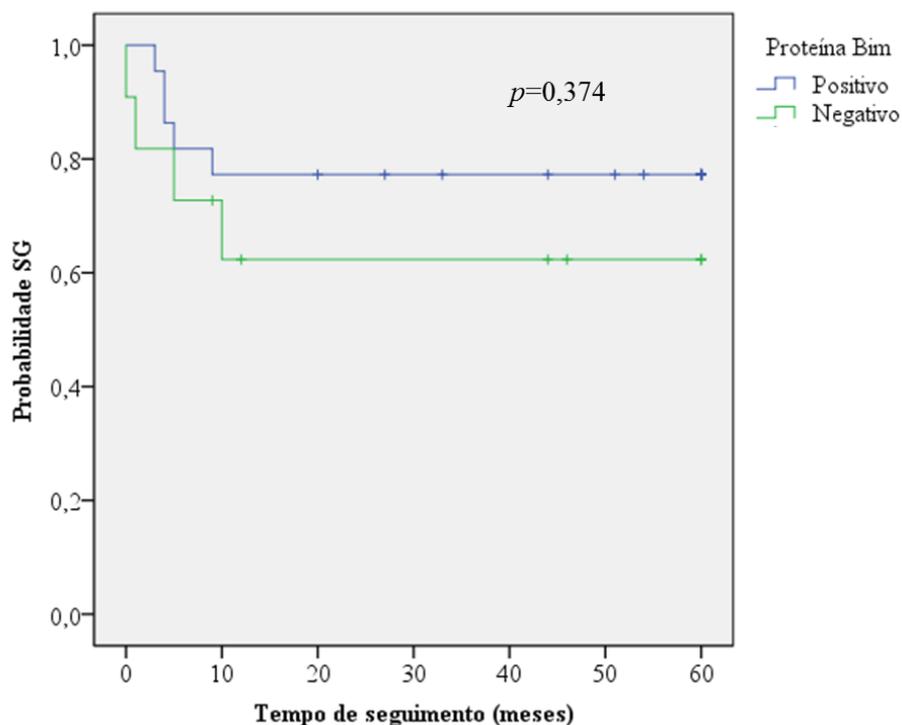


Figura 5.6: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global em cinco anos em relação à expressão da proteína BIM. A comparação entre as curvas foi realizada através do teste de Log-rank. $P < 0,050$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.6 Altos níveis dos miR-17 e miR-20a foram correlacionados à ausência da expressão proteica de BIM em amostras tumorais de LB

Analizamos o impacto da expressão de cada miRNA do *cluster 17-92* na expressão protéica de BIM, uma vez que esses miRNAs podem impedir a tradução desta proteína. Sendo assim, avaliamos se os níveis relativos de expressão dos miRNAs eram diferentes entre as amostras tumorais que expressavam ou não BIM, e observamos que a presença de altos níveis de expressão do miR-17 e miR-20a estavam associados a ausência de expressão de BIM ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente). Adicionalmente, não foi observada associação entre os níveis de miR-19a, miR-19b e miR-92a ($p = 0,131$, $p = 0,286$ e $p = 0,138$, respectivamente) como mostrado na figura 5.7.

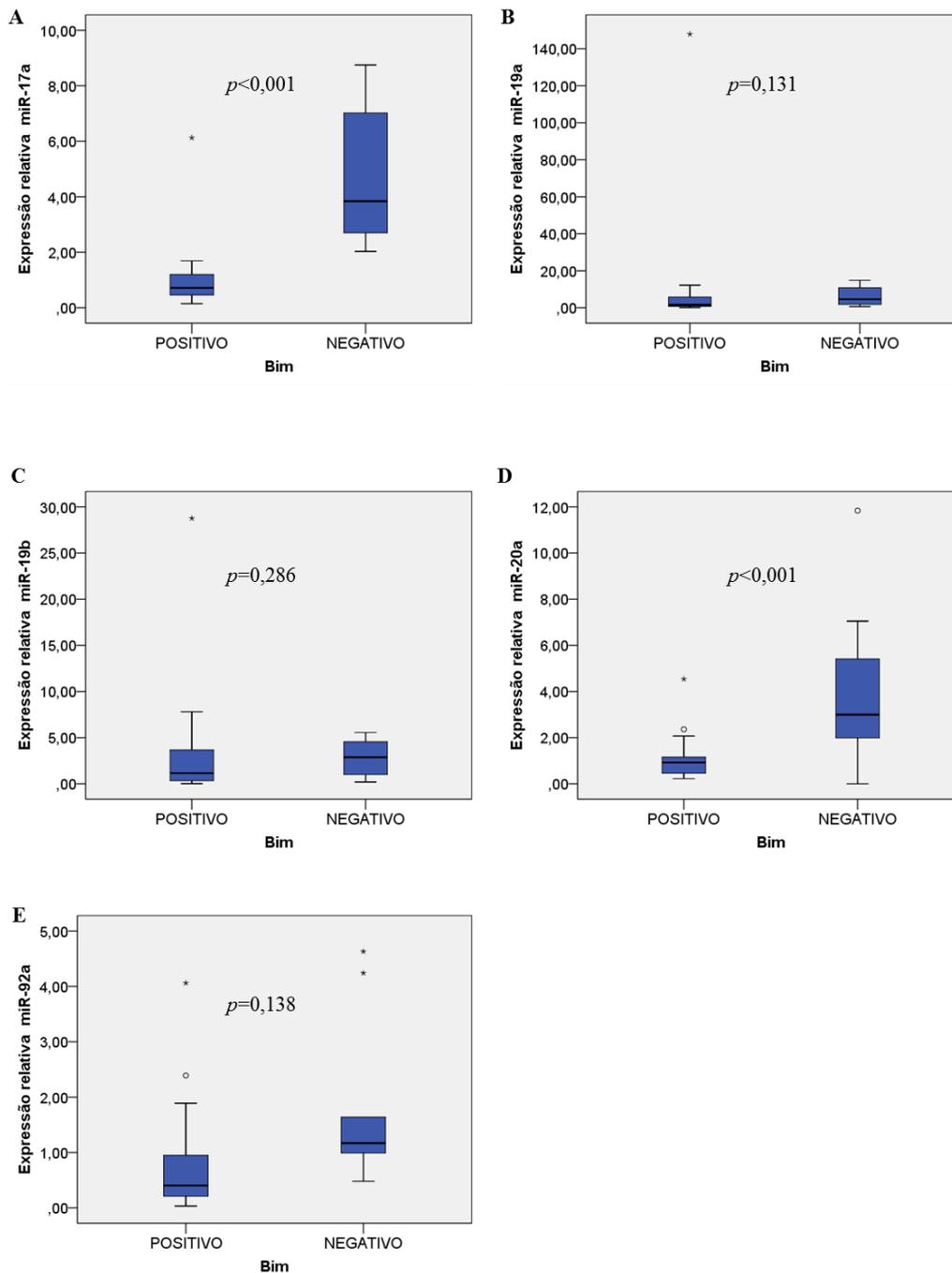


Figura 5.7: Análise dos níveis de miRNAs em relação a expressão da proteína BIM em amostras tumorais de LB. Em A, B, C, D e E níveis do miR-17a, miR-19a, miR-19b miR-20a e do miR-92a associados a expressão proteica de BIM. A quantificação dos miRNAs foi realizada por PCR em tempo real, utilizando uma amostra de linfonodo reacional como referência e a detecção da expressão de BIM por imuno-istoquímica. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Teste Mann Whitney.

5.7 Inibição do miR-17 em linhagem de LB leva ao aumento dos níveis de BIM

Uma vez que o miR-17 teve uma associação com a expressão de BIM em amostras de pacientes com LB, nós fomos investigar o efeito da inibição do miR-17 em células derivadas do LB. Observamos um aumento na expressão das três isoformas da proteína BIM na linhagem Daudi transfectada com o inibidor de miR-17 decorridos 24 e 48 h da transfecção. Além disso, foi detectado um aumento de c-MYC no tempo de 24 h, corroborando a alça de regulação existente entre o *cluster* 17-92 e c-MYC (Figura 5.8).

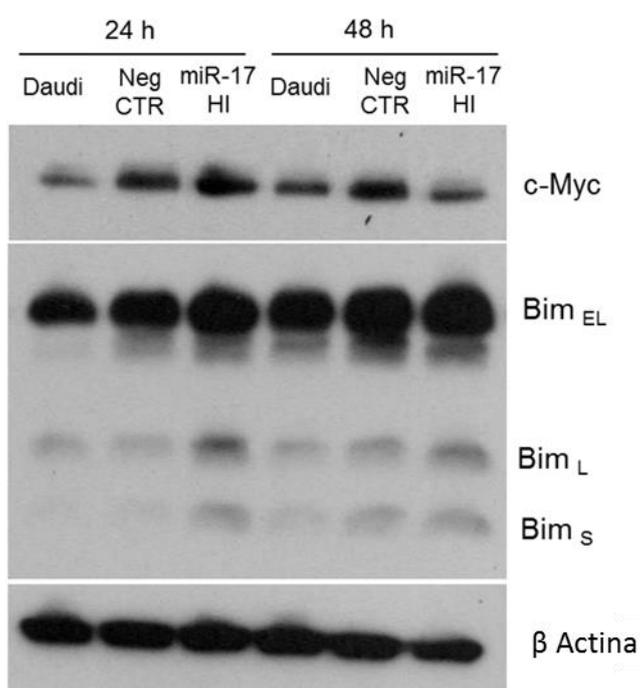


Figura 5.8: Inibição do miR-17 utilizando o inibidor *hairpin* na linhagem Daudi. A expressão de BIM e c-MYC foram analisadas nas células transfectadas com o inibidor *hairpin* (HI) ou controle negativo. A inibição do miR-17 causou um aumento de c-MYC em 24 horas após a transfecção e aumento das três isoformas: Bim EL (*extra large*), Bim L (*large*) e Bim S (*small*) de BIM em 24 e 48 horas. Os níveis de β-actina foram utilizados como normalizador. Figura representativa de dois experimentos independentes.

5.8 Expressão alta de miR-17 foi associada a uma pior sobrevida no LB pediátrico

Em seguida, nós nos questionamos se os membros do *cluster miR-17-92* estariam associados com o prognóstico do LB pediátrico. A expressão relativa média foi utilizada como ponto de corte para avaliar a relação entre a sobrevida global dos pacientes com LB e a expressão do miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a e miR-92a. A expressão acima ou abaixo do valor médio de expressão foi considerada alta e baixa expressão, respectivamente. A sobrevida global foi analisada em 39/41, 35/41, 35/41, 39/41 e 38/41 pacientes em relação ao miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a e miR-92a, respectivamente. Notavelmente, pacientes com altos níveis de expressão do miR-17 apresentaram uma sobrevida global em cinco anos inferior aos pacientes com baixos níveis ($p=0,007$) (Figura 5.9A). Além disso, a análise multivariada revelou que o miR-17 é um fator de prognóstico independente no LB (HR=3,68, $p=0,034$) tabela 5.5. Também observamos que pacientes com altos níveis de miR-19a e miR-20a apresentaram uma tendência a pior sobrevida global ($p=0,06$ e $p=0,078$, respectivamente) (Figura 5.9B e D). No entanto, os níveis de expressão do miR-19b e do miR-92a não tiveram impacto na sobrevida global dos pacientes em cinco anos ($p=0,20$ and $p=0,954$, respectivamente) (Figura 5.9C e E).

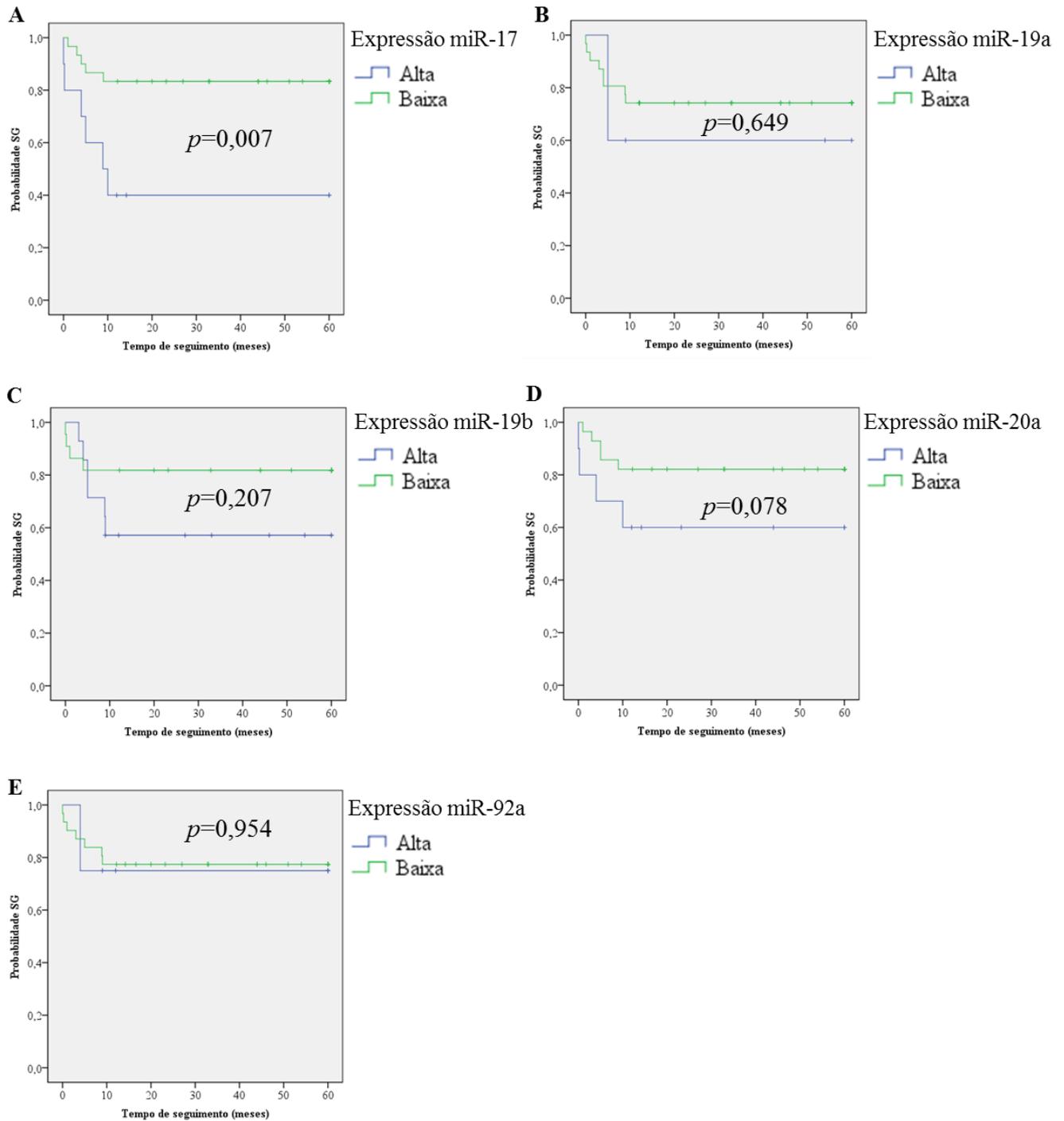


Figura 5.9: Curvas de Kaplan-Meier das sobrevidas globais em 5 anos em relação aos níveis de expressão de miRNA no LB. Os pacientes foram classificados em dois grupos (alta e baixa) de acordo com o nível de expressão de cada miRNA. Em A, sobrevida global dos pacientes com LB em relação ao nível de expressão do miR-17, em B, miR-19a, C, miR-19b. D, miR-20a, E, miR-92a. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 5.5 Impacto do miR-17 no prognóstico do LB através da análise multivariada

Variável	Risco relativo	Sobrevida Global		P valor
		95% IC Inferior	95% IC Superior	
Expressão de miR-17 (alta vs. baixa)	8,945	2,150	37,212	0,003
Nível de LDH	1,001	1,000	1,001	0,045
EBV (positivo vs. negativo)	0,334	0,075	1,489	0,150

5.9 A baixa expressão do miR-34 não teve impacto no prognóstico do LB

A perda de expressão da família miR-34 foi um evento frequente no LB pediátrico. Os níveis médios de expressão relativa do miR-34a, miR-34b e miR-34c foram de 0,2, 0,6 e 0,2, respectivamente, como mostrados na tabela 5.3 e figura 5.3. Estes valores foram utilizados como ponto de corte para avaliar o impacto desses miRNAs na sobrevida global dos pacientes com LB. Desse modo, observamos que a família miR-34 não teve associação com o prognóstico do LB pediátrico conforme descrito na tabela 5.6.

Tabela 5.6: Expressão de miRNAs da família miR-34 em relação à sobrevida dos pacientes com LB

Expressão	n	SG (%)	EP (%)	P valor
miR-34a				
> média	21	81	4,9	0,588
< média	27	74	4,7	
miR-34b				
> média	30	70	5,9	0,316
< média	31	80,6	3,8	
miR-34c				
> média	9	66,7	8,7	0,400
< média	12	83,3	6,2	

n: número de pacientes; SG: sobrevida global; EP: erro padrão

5.10 A Decitabina alterou o nível de expressão do miR-34b nas linhagens de LB

Mediante a baixa expressão do miR-34b nas amostras de pacientes, nós fomos investigar se a regulação poderia ser por metilação do DNA. Inicialmente avaliamos a expressão basal do miR-34b nas linhagens (BL41, Daudi e Raji) utilizando a mesma amostra de referência (linfonodo reacional) utilizada na quantificação das amostras tumorais. Com esta abordagem observamos baixos níveis de miR-34b nas linhagens assim como nas amostras tumorais de pacientes com LB (Figura 5.10). Posteriormente, as linhagens (Daudi, Raji, Namalwa e BL41) foram tratadas com doses crescentes do agente demetilante 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC, decitabina, SIGMA) e, em seguida, foi avaliada a expressão do miR-34b. Nas linhagens BL41, Daudi e Raji foi observado um aumento do miR-34b com todas as concentrações de decitabina. Já na linhagem Namalwa só foi observado um aumento na menor e maior concentração de decitabina utilizada. (Figura 5.11). Com este ensaio demonstramos que o tratamento com agente demetilante de DNA resultou na alteração do nível de expressão do miR-34b nas linhagens de LB.

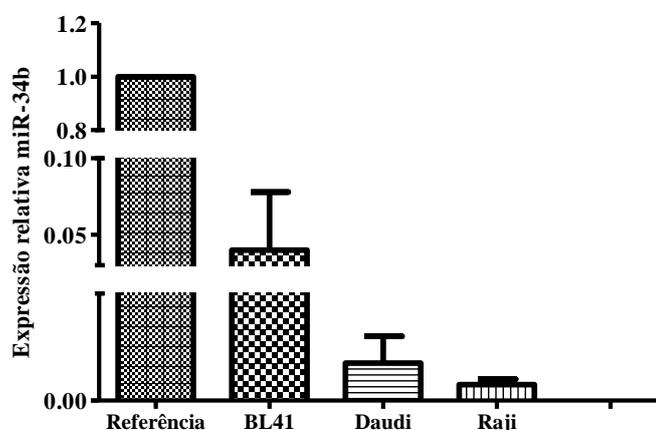


Figura 5.10: Expressão relativa do miR-34b nas linhagens BL41, Daudi e Raji. Os níveis de miRNAs foram quantificados por PCR em tempo real utilizando amostra de linfonodo reacional como amostra de referência. Gráfico representativo da média de 2 experimentos.

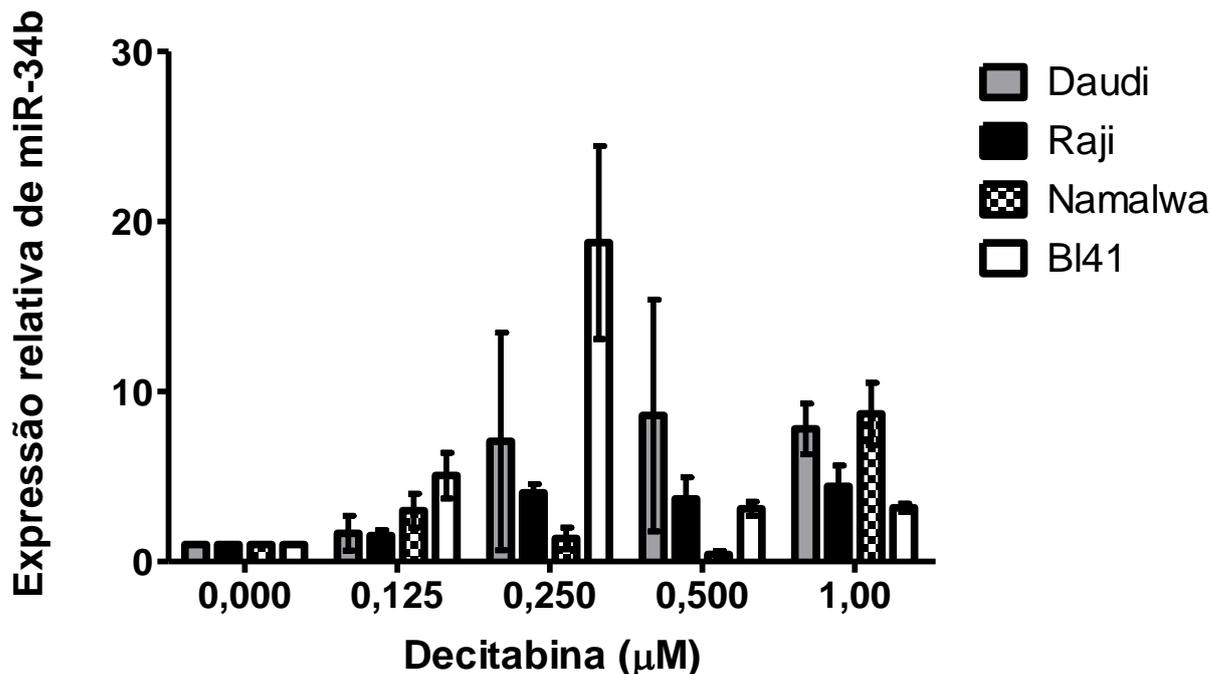


Figura 5.11: Expressão relativa do miR34b em linhagens de LB após o tratamento com Decitabina. A quantificação foi realizada por PCR em tempo real após o tratamento com diferentes concentrações de decitabina por 24 horas. Gráfico representativo da média de 2 experimentos +/- erro padrão.

5.11 Os níveis de RNAm de *c-MYC* foram alterados pela Decitabina nas linhagens de LB

Após avaliar o efeito da decitabina na expressão de miRNAs 34 avaliamos se o aumento de miR-34b teria como efeito a diminuição de *c-MYC* nas linhagens de LB. Assim, os níveis de RNAm de *c-MYC* foram avaliados por PCR em tempo real e detectamos que o tratamento promoveu uma diminuição de *c-MYC* nas linhagens Daudi e Raji de 0,83 e 1,4 vezes, respectivamente, na maior concentração de decitabina. No entanto, a linhagem BL41 apresentou aumento em duas concentrações de decitabina e a linhagem Namalwa em todas as concentrações, como mostrado na figura 5.12. Em seguida, avaliamos na linhagem Raji (maior diminuição de RNAm de *c-MYC*) se também haveria diminuição no nível de expressão de proteína. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração nos níveis da proteína *c-MYC* na linhagem Raji (Figura 5.13).

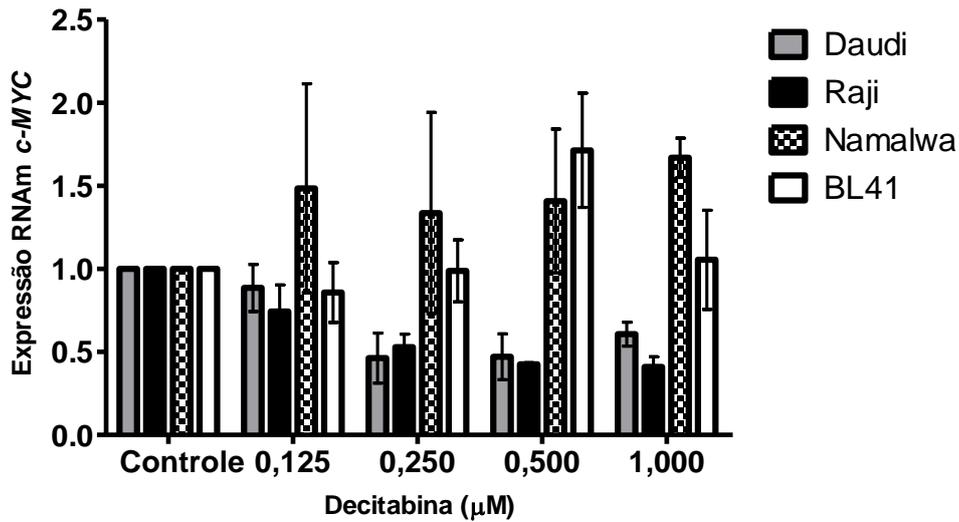


Figura 5.12: Expressão relativa de *c-MYC* nas linhagens de LB tratadas com Decitabina. A quantificação foi realizada por PCR em tempo real após o tratamento com diferentes concentrações de decitabina por 24 horas. Resultado expressando a média de dois experimentos independentes.

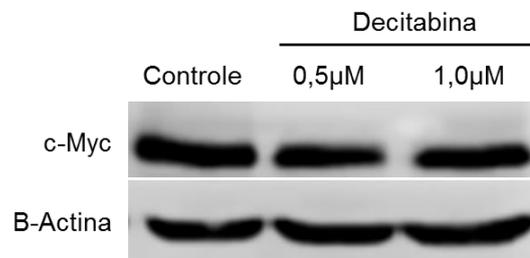


Figura 5.13: Expressão proteica de *c-MYC* na linhagem Raji em relação ao tratamento com Decitabina. Detecção foi realizada por western blotting após 24h de incubação com decitabina. Figura representativa de dois experimentos independentes.

5.12 A estabilização da proteína c-MYC não alterou a expressão de miRNAs do cluster 17-92

Considerando que c-MYC atua na regulação de vários miRNAs, o próximo passo foi avaliar a expressão dos miRNAs mediante a estabilização da proteína c-MYC. Para isso, as linhagens Ramos e Daudi foram tratadas em diferentes tempos com CHIR 99021, inibidor de GSK3 β que impede a fosforilação de c-MYC e consequentemente a proteína c-MYC não é degradada. Após 2 horas de incubação com CHIR já foi possível detectar inibição da fosforilação de c-MYC e consequentemente acúmulo de c-MYC (Figura 5.14). Também foram avaliados os níveis de β -catenina, outro alvo acumulado com a inibição de GSK3 β , a fim de verificar a atividade do inibidor. Dessa forma, observamos que um acúmulo de GSK3 β em todos os tempos avaliados com o CHIR em ambas as linhagens.

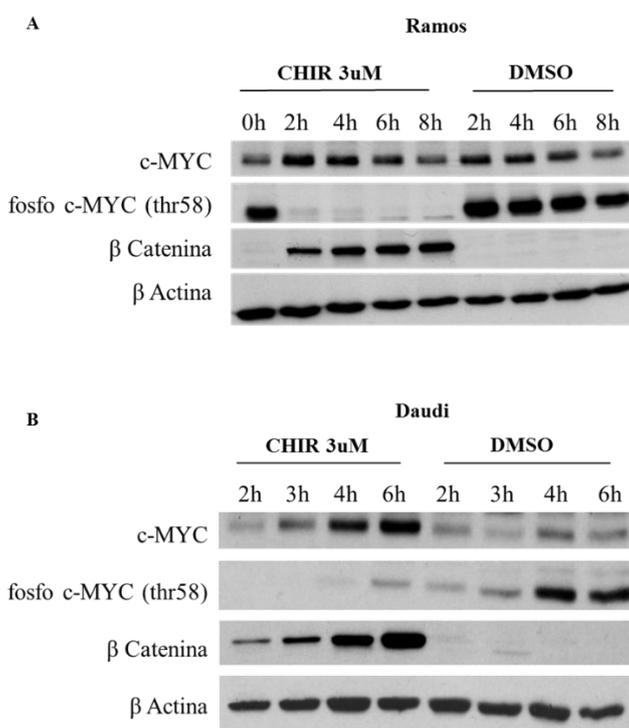


Figura 5.14: Níveis de c-MYC total e fosforilada nas linhagens Ramos e Daudi. As células Ramos (A) e Daudi (B) foram avaliadas em diferentes tempos de exposição ao CHIR (3 μ M) e ao veículo (DMSO). β -actina foi utilizada como normalizador. Acúmulo de β catenina representa a eficiência do inibidor CHIR. Figura representativa de três experimentos independentes.

Posteriormente fomos avaliar o efeito da estabilização de c-MYC na expressão dos miRNAs. Quantificamos os miRNAs do *cluster* 17-92 (miR-17, miR-19b e miR-92a) na linhagem Ramos expostas ao CHIR em diferentes tempos e não observamos alteração nos níveis de expressão dos miRNAs.. Além disso, investigamos outros miRNAs que não fazem parte do *cluster* 17-92, mas que também são regulados por c-MYC (miR-15a e miR-150). No entanto, também não observamos alteração da expressão do miR-15a. Já em relação ao miR-150, observamos um aumento de expressão apenas no tempo de 4 horas como mostrado na figura 5.15. Desse modo, a estabilização de c-MYC não promoveu um aumento na expressão de miRNAs na linhagem Ramos.

Um padrão semelhante de expressão de miRNA também foi observado na linhagem Daudi mediante a utilização do CHIR. Observamos uma pequena variação na expressão dos miRNAs do *cluster* 17-92 (miR-17, miR-19b e miR-92a). A expressão do miR-17 e miR-19b aumento cerca de 50% no ponto de 3 horas e depois detectamos uma redução dos níveis de miRNA nos tempos de 4 e 6 horas. Em relação ao miR-92, um aumento de cerca de 20% na expressão foi observado após 3 horas de incubação acompanhado de redução na expressão nos tempos posteriores. Também estendemos a análise para miRNA fora do *cluster* 17-92 mas que também regulados por c-MYC. Desse modo, avaliamos a expressão do let7-a e detectamos um aumento em torno de 30% na incubação de 3 horas, não ocorrendo alteração e/ou redução da expressão nos demais tempos de incubação. Adicionalmente, testamos se uma incubação mais prolongada seria capaz de ativar a expressão dos miRNAs e não observamos alteração na expressão do miR-17 e miR-19b após 12 horas de incubação e a detecção de redução com 24 horas. (Figura 5.16).

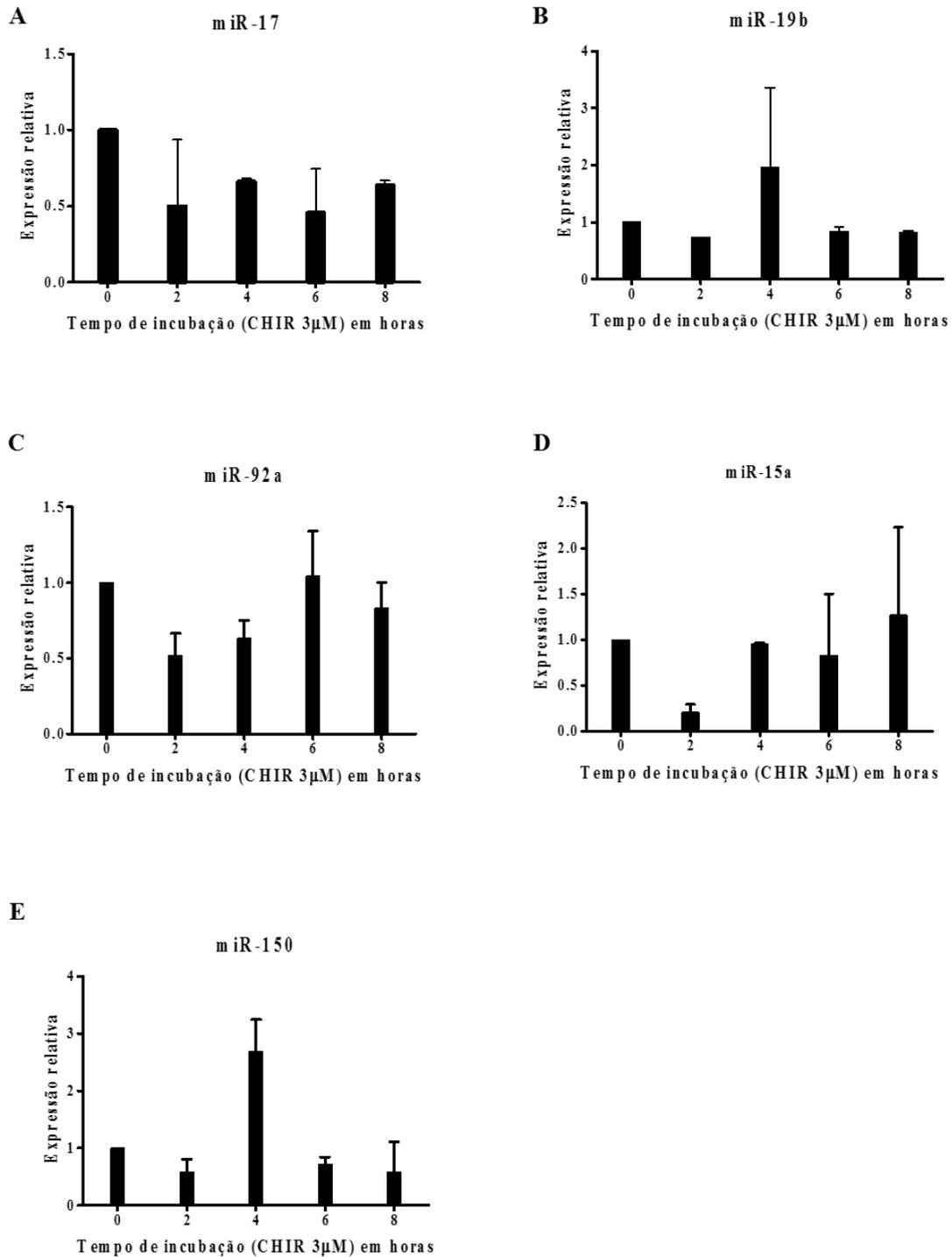


Figura 5.15: Expressão de miRNAs mediante estabilização proteica de c-MYC na linhagem Ramos. (A) níveis relativos do miR-17, em (B) miR-19b, em (C) miR-92a, em (D) miR-15a e em (E) miR-150. A quantificação foi feita por PCR em tempo real utilizando como amostra referência as células incubadas com o veículo (DMSO). Os resultados estão expressos através da média e erro padrão de três experimentos independentes.

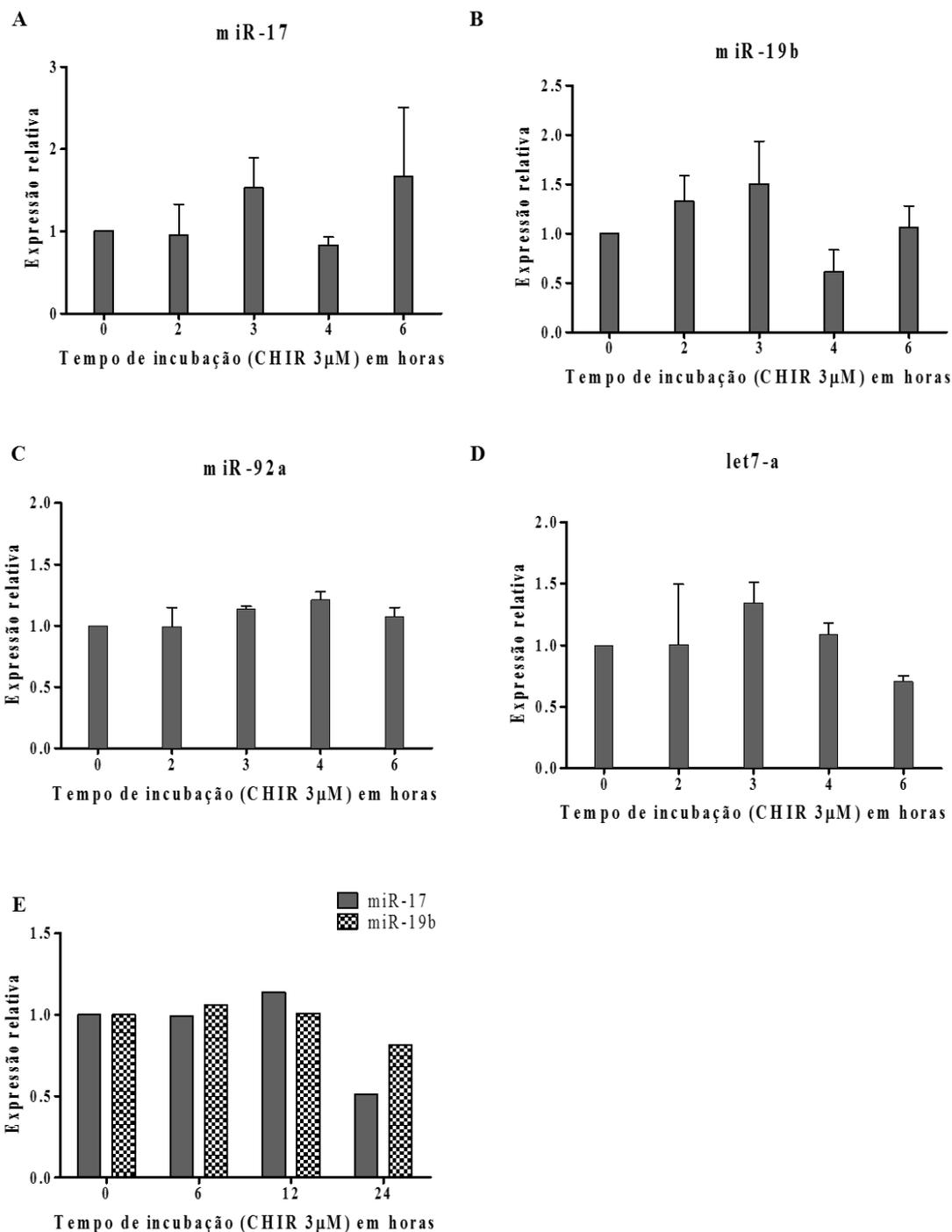


Figura 5.16: Expressão de miRNAs mediante estabilização proteica de c-MYC na linhagem Daudi. (A) níveis relativos do miR-17, em (B) miR-19b, em (C) miR-92a, em (D) let7-a durante 2, 3, 4 e 6 horas de exposição ao CHIR e em (E) miR-17 e miR-19b nos tempos de 6, 12 e 24 horas. A quantificação foi feita por PCR em tempo real utilizando como amostra referência as células incubadas com o veículo (DMSO). Os resultados estão expressos através da média e erro padrão de três experimentos independentes.

5.13 A inibição de c-MYC reduz a transcrição do *cluster* miR-17-92

A fim de avaliar o tempo que a célula levaria para ativar a transcrição do *cluster* miR-17-92, nós utilizamos a linhagem P493-6 que possui o promotor de c-MYC regulado por tetraciclina e na presença da mesma não ocorre a transcrição de c-MYC. Sendo assim, nós inibimos a transcrição de c-MYC, quando as células são cultivadas com tetraciclina, e realizamos uma cinética para avaliar quanto tempo a célula demora para transcrever o *cluster* miR-17-92 a partir do ponto em que a expressão de c-MYC é reativada. Para isso, nós incubamos a linhagem P493-6 com tetraciclina e avaliamos a expressão da proteína c-MYC após a remoção da tetraciclina. Neste ensaio, detectamos que em apenas 2 horas na ausência de tetraciclina os níveis proteicos de c-MYC passaram a ser detectáveis (Figura 5.17A). Em seguida, avaliamos a expressão de RNAm de c-MYC e do transcrito primário do *cluster* miR-17-92 (MIRH1). Na presença de tetraciclina nós observamos uma expressão muito baixa de RNAm de *c-MYC* e do MIRH1 e trinta minutos após a remoção de tetraciclina já foi possível detectar um aumento na expressão de c-MYC e de MIRH1. Os níveis de RNAm de ambos os genes estavam expressos de forma semelhante ao controle (células cultivadas na ausência de tetraciclina) em apenas 2 horas após ausência de tetraciclina, corroborando os dados de expressão proteica (Figura 5.17B). Por fim, avaliamos a expressão do miR-17 e miR-92a. Desse modo, foi possível detectar os miRNAs em 24 horas de incubação com tetraciclina, uma diminuição nos níveis 30 minutos após a remoção de tetraciclina e aumento da expressão após 1 hora. Logo após 2 horas as células parecem reestabelecer a expressão dos miRNA, atingindo um platô (Figura 5.17C). Sendo assim, os níveis de miRNA maduros parecem ser estáveis na linhagem P493-6, uma vez que não são alterados mediante uma grande diminuição dos níveis do transcrito primário. Além disso foi possível detectar que 30 minutos são suficientes para as células aumentar a transcrição de miRNA.

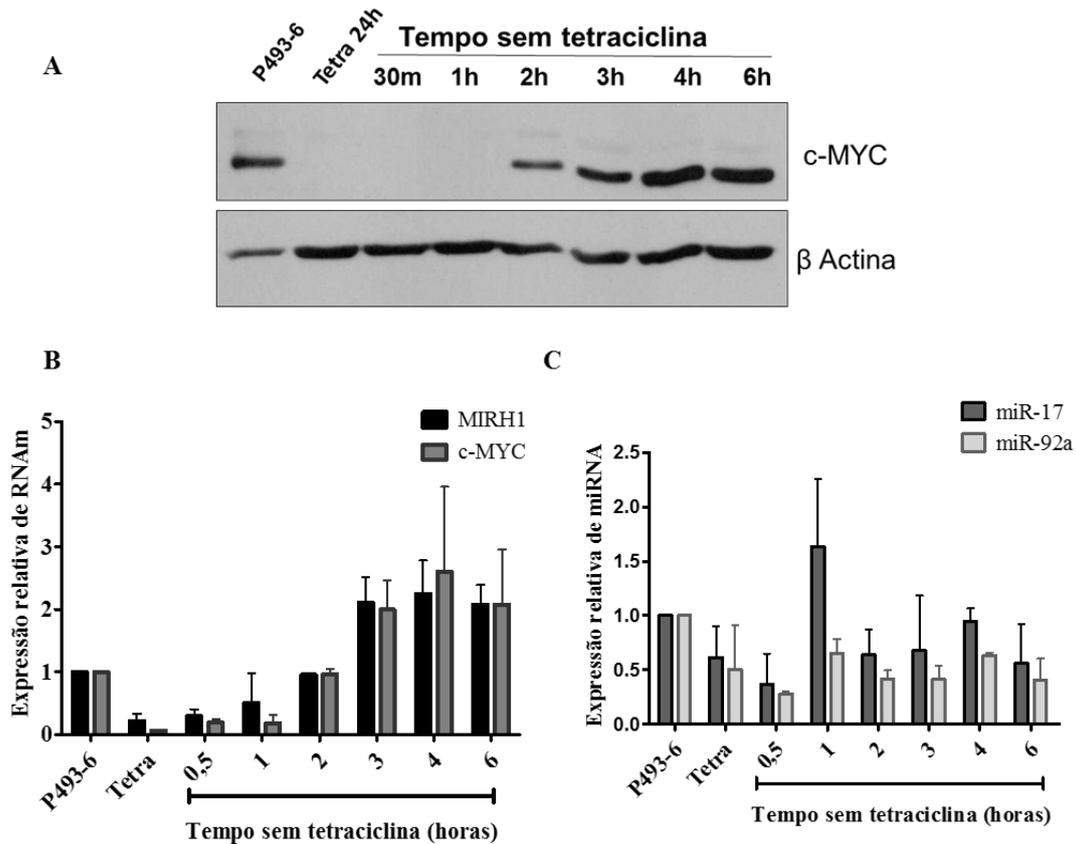


Figura 5.17: Avaliação da expressão do cluster miR-17-92 mediante reativação de c-MYC na linhagem P493-6. (A) Expressão de c-MYC por western blotting da linhagem P493-6 cultivada 24 horas com tetraciclina e em 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a remoção da tetraciclina. (B) Quantificação relativa de RNAm de c-MYC e MIRH1. (C) Níveis relativos do miR-17 e miR-92a. A quantificação foi feita por PCR em tempo real utilizando como amostra referência as células incubadas sem tetraciclina. Resultado expressando a média de dois experimentos independentes.

5.14 O tratamento com CHIR pode modular a localização da Drosha

Nossa próxima pergunta foi se o tratamento com inibidor de GSK3 β – CHIR – poderia modular a localização da Drosha. Tal questionamento teve como base a descrição de que a Drosha precisa ser fosforilada por GSK3 β para manter-se no núcleo (TANG *et al.*, 2011). Através de microscopia confocal observamos uma diminuição de Drosha no núcleo ($p=0,004$) na linhagem Ramos exposta ao CHIR por 2 horas (Figura 5.18).

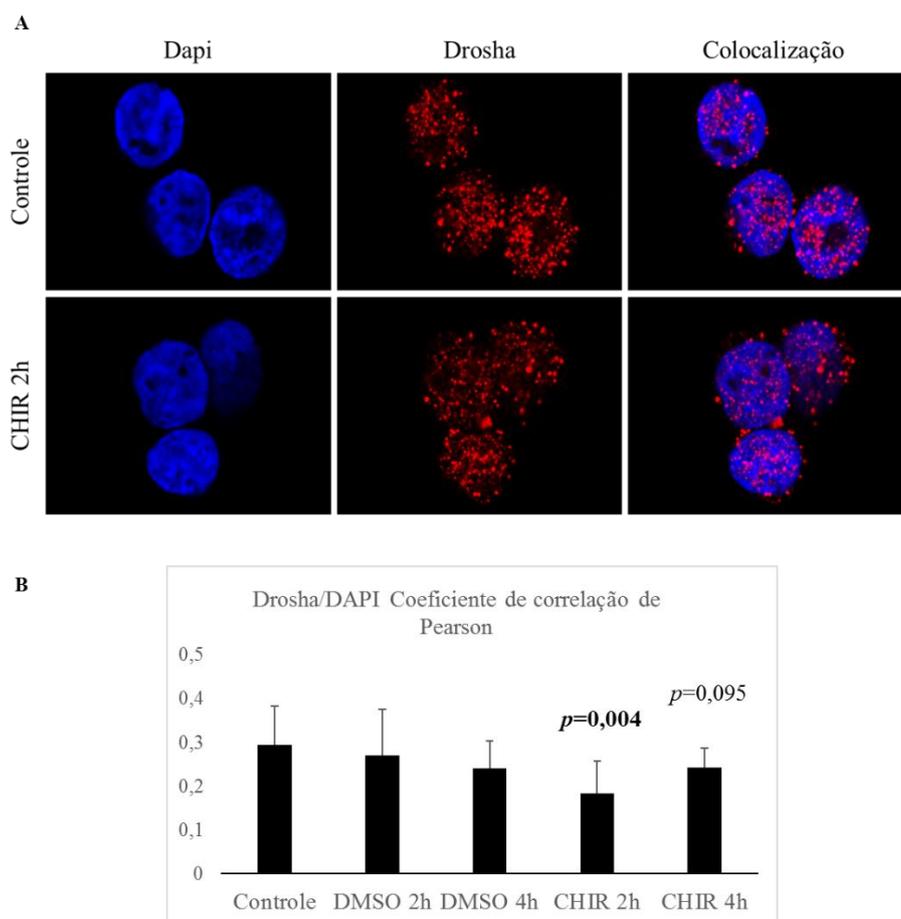


Figura 5.18: Análise da localização da Drosha mediante o tratamento com CHIR na linhagem Ramos. (A) Microscopia confocal evidenciando a localização difusa de Drosha em células controles e incubadas com CHIR à 3 μ M por 2 horas. (B) Análise estatística da diferença entre a colocalização (marcação de Dapi e Drosha) pelo Teste ANOVA. No gráfico estão plotados os valores da correlação de Pearson dos *pixels* azul e vermelho localizados na sobreposição das marcações. Foram quantificadas nove imagens de diferentes campos.

5.15 A Drosha S300/302 mutante localiza-se no citoplasma

Nosso próximo passo foi avaliar a importância do sítio S300/302 - fosforilado por GSK3 β (TANG *et al*, 2011) na localização subcelular da Drosha, tendo em vista nosso resultado anterior de que o CHIR pode alterar a localização da Drosha. Desse modo, transfectamos a linhagem 293T com Drosha selvagem fusionada a GFP e com a Drosha S300/302 mutante fusionada a GFP. Sendo assim, foi possível observar que na presença

da mutação na S300/302 a Drosha localiza-se predominantemente no citoplasma como mostrado na figura 5.19.

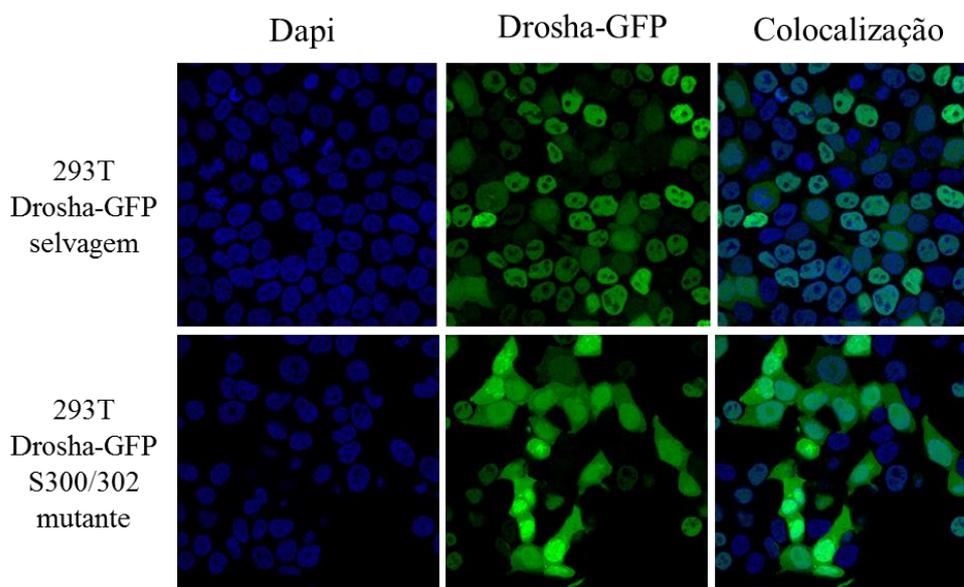


Figura 5.19: Microscopia confocal das células 293T transfetadas com Drosha-GFP selvagem e Drosha S300/302 mutante-GFP. Drosha S300/302 mutante localiza-se predominantemente no citoplasma e a proteína selvagem no núcleo.

Por fim, fomos investigar se a concentração de CHIR utilizada para estabilizar c-MYC poderia modular a localização da Drosha selvagem e mutante. Sendo assim, incubamos as linhagens com 3 μ M de CHIR por 6 horas, realizamos o fracionamento subcelular e detectamos uma diminuição da Drosha selvagem no compartimento nuclear. Já a Drosha mutante que se encontra predominantemente no citoplasma não sofreu alteração com a utilização do CHIR (figura 5.20). Esses resultados apontam que a inibição de GSK3 β modula a localização da Drosha, uma observação que pode ter impacto na biogênese dos miRNAs que necessitam da Drosha presente no núcleo.

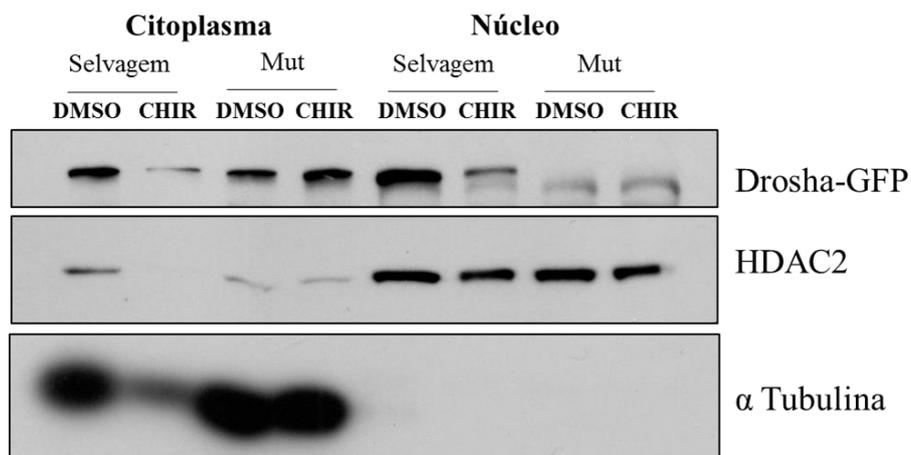


Figura 5.20: Expressão de Drosha-GFP nas frações subcelulares incubadas com CHIR por Western blotting. As células 293T expressando Drosha-GFP selvagem e Drosha S300/302 mutante foram incubadas com 3 μ M de CHIR durante 6 horas e submetidas ao fracionamento subcelular. HDAC2 e α tubulina foram utilizadas como controles constitutivos nuclear e citoplasmático, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

Os LNH constituem o quarto tipo de tumor mais comum em crianças, sendo o linfoma de Burkitt o subtipo de LNH mais prevalente, representando de 30 a 50% dos linfomas da infância, seguido do LDGC-B (HUANG *et al.*, 2015). No entanto, com o aumento da idade esse quadro altera-se e, em adolescentes e adultos, observa-se uma frequência maior do LDGC-B enquanto que o LB torna-se mais raro (PATTE *et al.*, 2007). No Brasil, também foi observado uma diminuição na incidência do LB conforme o avanço da idade sendo a mediana de incidência 4.7/milhão na faixa etária de 1-4 anos de idade, 3.6/milhão entre 5-9 anos e 0,65 após 9 anos. (OLIVEIRA FERREIRA *et al.*, 2012). Em nosso estudo também observamos uma frequência maior de pacientes abaixo de 12 anos de idade um padrão semelhante ao linfoma de Burkitt esporádico de outras regiões geográficas (OLIVEIRA FERREIRA *et al.*, 2012).

Atualmente, a utilização de regimes intensos de quimioterapia tem levado a cura do LB, com taxas de sobrevida em cinco anos de 90-100% para pacientes de baixo risco em países desenvolvidos (CAIRO *et al.*, 2007; PATTE *et al.*, 2007). Já nos países em desenvolvimento como o Brasil, a taxa de sobrevida é um pouco inferior em torno de 80% (KLUMB *et al.*, 2004), e em alguns países com índice mais baixo de desenvolvimento se situa em torno de 65% (MOLETI *et al.*, 2007). Na coorte estudada, nós encontramos uma sobrevida global de 77% (erro padrão 3,2%) estando de acordo com o demonstrado anteriormente. Esta diminuição da sobrevida está associada ao fato de que nos países em desenvolvimento o tratamento é menos intensivo com redução das doses do quimioterápico metotrexate visando reduzir a morbidade e mortalidade em condições em que o suporte para o tratamento não é o ideal. A principal complicação que limita o tratamento de suporte é a imunossupressão que resulta em neutropenia e infecções para variados microrganismos. Esta situação demanda tratamento de suporte com antibióticos e anti-fúngicos de última geração, equipes altamente especializadas e sistema de controle e monitoramento das infecções muito estruturado. (SCHMITZ *et al.*, 2014). A ausência desta infraestrutura é ainda mais grave na região da África onde incidem os casos de LB endêmico. Nestas regiões já descritas previamente as crianças com diagnóstico de LB

recebem doses menores de quimioterapia, às vezes só monoterapia com o quimioterápico ciclofosfamida, não tem acesso ao tratamento de suporte ideal e apresentam uma taxa de sobrevida bastante inferior (30%-50%) (OREM *et al.*, 2008). Desse modo, um tratamento mais específico com menor toxicidade que resulte em menor imunossupressão é extremamente necessário para o LB pediátrico visando aumentar a sobrevida e diminuir a morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento, enquanto que a longo prazo, para os países desenvolvidos o diferencial seria a redução das complicações tardias como infertilidade, cardiotoxicidade e segunda neoplasia.

Em nosso estudo, a análise das características clínicas dos pacientes revelou um predomínio dos estágios III/IV que caracterizam doença mais avançada, e em 45,5% dos pacientes foram detectados níveis séricos de LDH duas vezes acima do normal (>1000 UI/L). Este marcador biológico tem sido utilizado na estratificação da intensidade do protocolo e, especialmente no estágio III da doença, auxilia na separação dos grupos de maior risco (KLUMB *et al.*, 2003; PATTE *et al.*, 2007). Posteriormente, foi analisado o impacto das variáveis clínicas na SG dos pacientes com LB. Em relação ao estadiamento foi observado um desfecho clínico desfavorável para os pacientes com estádios III/IV ($p=0,044$). De acordo com os níveis séricos de LDH, estratificando em dois grupos - maior e menor que 1000 UI/L - foi detectada uma diferença significativa na SG ($p=0,002$). Já a presença do EBV no tumor não alterou a sobrevida dos pacientes de forma significativa ($p=0,096$). Esses dados corroboram outros estudos que também detectaram diferença significativa em relação ao estadiamento e ao nível da enzima LDH (KLUMB *et al.*, 2003; BURKHARDT *et al.*, 2011; MOLETI *et al.*, 2007). No entanto, a observação relativa ao impacto do EBV no prognóstico foi distinta de estudo anterior provavelmente pela limitação amostral do presente estudo (MINNICELLI C *et al.*, 2012).

A assinatura molecular do LB é a ativação do oncogene *c-Myc* através de translocações que envolvem o locus do gene *c-Myc* no cromossomo 8q24, para os loci das imunoglobulinas (IGs) no cromossomo 14q32 (cadeia pesada μ), 2p11 (cadeia leve κ) ou 22q11 (λ). Estas translocações justapõem toda a sequência codificante do gene *c-Myc* ao ativador transcricional do gene da *Ig* (LINDSTRÖM & WIMAN, 2002). Como resultado dessas translocações a proteína c-MYC passa a ser expressa de forma constitutiva ativando genes relacionados a diversos processos celulares como divisão

celular, metabolismo celular, apoptose, atividade do telômero, entre outros (HECHT & ASTER, 2002). Embora a translocação envolvendo *c-MYC* seja uma alteração do LB descrita como critério pela classificação de linfomas da Organização Mundial da Saúde (WHO), (CAMPO *et al.*, 2011), tem sido reportado que cerca de 7 a 19% dos LB não apresentam a translocação envolvendo *c-MYC*. Entretanto, estes casos, apresentam características clínicas, morfológicas e perfil de expressão gênica similar ao LB clássico (LONES *et al.*, 2004; DAVE *et al.*, 2006 HARALAMBIEVA *et al.*, 2004; HUMMEL *et al.*, 2006; POIREL *et al.*, 2009; NELSON *et al.*, 2010; SALAVERRIA *et al.*, 2014). Corroborando esses relatos, em nosso estudo não detectamos rearranjo de *c-Myc* em aproximadamente 15% dos casos avaliados. Importante ressaltar que o ponto de quebra do gene *c-Myc* pode variar no LB, ocorrendo em diferentes localizações com até 1 Kb de variação o que dificulta a análise por FISH (HARALAMBIEVA *et al.*, 2004). No entanto, em nosso estudo utilizamos um conjunto de sondas desenhado para detectar pontos de quebra sobre uma extensa região incluindo a clássica t(8;14), bem como as variantes t(2;8) e t(8;22). Além disso, nós observamos uma menor expressão dos níveis de RNAm de *c-Myc* nas amostras dos pacientes sem a translocação do que nos pacientes com a translocação (figura 5.4). Essa mesma observação foi obtida num estudo realizado recentemente, descartando a possibilidade de uma falha na detecção da translocação por FISH (SALAVERRIA *et al.*, 2014). Adicionalmente, alterações cromossômicas na região 11q – uma alteração descrita no estudo mencionado – foram encontradas apenas nos casos de BL que não apresentavam translocações envolvendo *c-Myc* sugerindo mecanismos moleculares distintos na patogênese do LB sem as translocações clássicas (SALAVERRIA *et al.*, 2014).

Adicionalmente, outras alterações moleculares vêm sendo descritas na patogênese do LB, uma vez que a desregulação de *c-MYC* exclusivamente não é suficiente para o desenvolvimento tumoral. Em um elegante estudo recente, foi descrito um novo modelo de patogênese para o LB a partir da identificação da cooperação da via de PI3K com *c-MYC* na patogênese do LB (SCHMITZ *et al.*, 2012). Reforçando o papel da via de PI3K no LB, estudos do nosso grupo demonstraram que a combinação de inibidor de histona deacetilase com quimioterápico inibe a proliferação de células de LB através da regulação da via de PI3K (FERREIRA *et al.*, 2014; 2016). Além disso, num estudo prévio,

observamos inativação de P16INK4a na maioria das amostras tumorais de LB pediátrico, sendo detectada a metilação da região promotora do gene *P16INK4a* como mecanismo de inativação da transcrição gênica. Desse modo, a inativação de P16INK4a foi apontada como um evento relevante na patogênese do LB (ROBAINA *et al.*, 2015, anexo 10.3). Neste contexto, a ativação da proliferação celular através da desregulação das vias de PI3K e P16INK4a, constituem mecanismos importantes na patogênese do LB capazes de sobrepujar os efeitos apoptóticos ativados através da expressão aumentada de c-MYC (SCHMITZ *et al.*, 2012).

A complexidade das alterações decorrentes da expressão constitutiva de c-MYC ficaram ainda maiores com a descoberta que c-MYC também se liga em sequências regulatórias de DNA e modula a expressão de RNAs não-codificantes como os miRNAs. c-MYC reprime múltiplos miRNAs classificados como supressores tumorais tais como miR-15a, a família let7, famílias miR-34, miR-29 e miR-150 (CALIN GA, *et al.*, 2002; CHANG TC, *et al.*, 2008). Embora, mecanismo pelo qual c-MYC é capaz de reprimir os miRNAs não tenha sido totalmente elucidado, alguns estudos recentes têm mostrado que o papel de MYC é dependente do recrutamento de enzimas modificadoras de histonas. No linfoma de células do manto (LCM) foi descrito que MYC recruta a histona deacetilase 3 (HDAC3) juntamente com EZH2 e promove a diminuição da expressão do miR-29 (ZHANG X *et al.*, 2012). Uma baixa expressão de miRNAs da família miR-29 também foi descrita pelo nosso grupo no LB pediátrico. Além disso, observamos um aumento na expressão das DNA metil transferases 1 e 3B (DNMT1 e DNMT3B) que são alvos da repressão transcricional da família miR-29. Sendo assim, o miR-29 juntamente com a desregulação das enzimas DNMTs desempenham um papel relevante na patogênese do LB (ROBAINA *et al.*, 2015). Além disso, o aumento na expressão das DNMTs também pode ser devido ao recrutamento por c-MYC das DNA metiltransferases (DNMT3A e DNMT3B) promovendo o silenciamento de genes alvos (BRENNER *et al.*, 2005).

Por outro lado, a superexpressão de c-MYC também tem como efeito o aumento da expressão de vários miRNAs com características oncogênicas, dentre eles, está incluído o *cluster* miR-17-92 que foi o primeiro *cluster* de miRNAs descrito, cujos efeitos estão relacionados à inibição da apoptose, aumento da proliferação celular, metástase,

angiogênese e metabolismo celular (XIONG L, *et al.*, 2013). O *cluster* miR-17-92 possui seis miRNAs maduros distintos (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, e miR-92a) e está localizado no terceiro intron do gene *C13orf25* (cromossomo 13 *open reading frame 25*), região frequentemente amplificada no LB, linfoma folicular, LCM e LDGC-B. (OTA *et al.*, 2004; TAGAWA *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2006). Esses miRNAs são transcritos como miRNA primários (pri-miRNA) e em sequência processados separadamente, formando um miRNA maduro individual (YU *et al.*, 2006). Dessa forma, é possível que todos os miRNAs do *cluster* sejam expressos em níveis semelhantes. A expressão do miR-17-92 é ativada através da ligação de c-MYC na região E-box localizada no primeiro íntron do gene (O'DONNELL, *et al.*, 2005). A expressão aumentada do *cluster* miR-17-92 tem sido observada em linfomas de células B e em vários outros tipos de tumores sólidos, como câncer de mama e pulmão, reforçando o potencial tumorigênico desse *cluster* de miRNAs (HE *et al.*, 2005; OTA *et al.*, 2004; TAGAWA *et al.*, 2005). De fato, o papel oncogênico do *cluster* foi confirmado através do modelo de LB, o camundongo *Eμ-Myc*. Utilizando este modelo, foi possível observar uma aceleração da linfomagenese devido à inibição da morte celular por apoptose causada pela superexpressão concomitante de c-MYC e do *cluster* 17-92 (HE *et al.*, 2005).

Um estudo recente utilizando sequenciamento de RNA mostrou que a expressão do miR-17-92 é dez vezes maior no LB do que no LDGC-B. Mais detalhadamente, este estudo detectou que os 28 casos de LB analisados apresentavam superexpressão do miR-17-92 (SCHMITZ *et al.*, 2012). Outro grupo em diferente abordagem analisou o perfil de expressão dos miRNAs no LB utilizando uma análise integrada entre o perfil de expressão de miRNA e RNAm, mostrando que pelo menos 40 a 50 genes são alvos de membros do *cluster* miR-17-92 regulados por c-MYC no LB. Estes autores detectaram superexpressão dos miRNAs e baixa expressão do gene alvo correspondente em 36 amostras de LB (IQBAL *et al.*, 2015). No presente estudo, nós avaliamos se havia diferença entre os níveis relativos de expressão de miRNAs codificados pelo mesmo gene, *C13orf25*, e controlados pelo mesmo promotor – miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a e miR-92 – em até 56 amostras de tumores de LB pediátrico. A nossa abordagem teve como foco cada miRNA do *cluster* avaliado individualmente, pois são descritos como repressores da proteína pró-apoptótica BIM e outros alvos relevantes no LB (OLIVE *et al.*, 2013).

Em nosso estudo nós observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis dos miRNAs do *cluster* 17-92 em amostras tumorais de LB ($p=0,0006$). Diferença na biogênese dos miRNAs codificados por gene policistrônico, ou seja, que através de um único precursor transcreve diferentes miRNAs, pode ocorrer devido as diferenças biológicas de cada miRNA ocasionando que cada miRNA tenha uma meia-vida e um *turnover* diferente (OLIVE *et al.*, 2013). Além disso, podem ocorrer diferenças no processamento dos miRNAs que são regulados por proteínas de ligação ao RNA (MICHLEWSKI *et al.*, 2008). A nossa análise mostrou que o miR-92a foi o membro menos expresso do *cluster* em relação aos demais membros avaliados: miR-17, 19a, 19b e 20a ($p=0,0001$, $p=0,0003$, $p=0,0310$, $p=0,0043$, respectivamente). O mecanismo responsável por essas diferenças nos níveis de expressão entre os membros do *cluster* miR-17-92 identificado por nós ainda é desconhecido. Além disso, o papel de cada miRNA deste *cluster* no BL ainda não foi elucidado (LAI *et al.*, 2015). No entanto, já foi descrito que o miR-92 tem como alvo FBW7, uma proteína envolvida na degradação de c-MYC. Desse modo, a expressão do miR-92 leva uma inibição de FBW7 e, consequentemente, resulta no aumento dos níveis de c-MYC. Altos níveis de c-MYC promovem um aumento na proliferação celular e ativação de apoptose dependente de p53 (HEMANN *et al.*, 2005). Uma hipótese plausível é que através de um mecanismo de *feedback* negativo, o miR-92 é reprimido, diminuindo os níveis de c-MYC e da apoptose induzida por c-MYC.

Iqbal e colaboradores, compararam a expressão do miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a com a expressão detectada em centroblastos (linfócitos do centro germinativo) e observaram maior expressão de todos os membros do *cluster* 17-92 nas amostras e linhagens de LB em relação aos centroblastos. No referido estudo, a análise foi feita pelo ensaio de microarranjo e não foi possível comparar os níveis de expressão entre os membros do *cluster* (IQBAL *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram que a expressão do miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a e miR-92a é maior nas amostras de LB pediátrico do que em linfonodo reacional. No entanto, mesmo tendo utilizado todos os tipos celulares do conteúdo celular de um linfonodo reacional foi possível pela primeira vez, comparar o nível da expressão de miRNA entre cada membro do *cluster* 17-92 em um número significativo de casos de LB pediátrico.

O efeito oncogênico do miR-17-92 tem sido associado em linfomas à desregulação de PTEN e BIM, duas proteínas supressoras tumorais com atividade antiproliferativa e pró-apoptótica, respectivamente, com envolvimento importante no desenvolvimento do linfócito B (OLIVE V *et al.*, 2009). Nesta linha de raciocínio, fomos investigar a correlação entre níveis dos miRNAs e a expressão proteica de BIM. Esta análise mostrou que altos níveis de miR-17 e miR-20 ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente), mas não de miR-19a, miR-19b e miR-92a estavam associados com a ausência da expressão da proteína BIM ($p = 0,031$, $p = 0,286$, $p = 0,138$, respectivamente). BIM é uma proteína pró-apoptótica fundamental no controle da apoptose dos linfócitos B. Durante a ontogenia dos linfócitos B, a expressão de BIM é diminuída através do *cluster* miR-17-92 para promover a sobrevivência das células B progenitoras. (VENTURA A *et al.*, 2008). No entanto, experimentos com camundongos adultos mostraram que a expressão constitutivamente aumentada do miR-17-92 promove o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas. Também a deleção de um apenas um alelo de BIM mimetiza os efeitos do miR-17-92 (XIAO C *et al.*, 2008). Adicionalmente, padrões aberrantes de metilação na região promotora de *Bim*, como forma de silenciamento gênico, têm sido demonstrados em linhagens derivadas do LB (MESTRE-ESCORIHUELA *et al.*, 2007; PASCHOS *et al.*, 2009). Em estudo prévio (dissertação de mestrado MCR), nosso grupo detectou por pirosequenciamento metilação na região promotora de *Bim* em 11 de 21 casos de BL. Entretanto, não foi observada associação entre a metilação e perda de expressão proteica de BIM ($p = 0,635$, dados não mostrados). Afim de validar a regulação de BIM no modelo de LB, transfectamos a linhagem Daudi derivada de um caso de LB, com o inibidor de miR-17. Após a transfecção foi possível observar um aumento na expressão das três isoformas da proteína BIM. Além disso, foi detectado um aumento de c-MYC, corroborando a alça de regulação existente entre o *cluster* 17-92 e c-MYC. Estes nossos resultados destacam e reforçam o papel relevante da inativação de BIM na patogênese do LB como uma forma de alterar o balanço entre a apoptose e proliferação na tumorigênese induzida por c-MYC (PSATHAS *et al.*, 2014).

Em continuidade ao estudo foi investigado o papel dos miRNAs do *cluster* miR-17-92 no prognóstico do LB pediátrico. Dentre os miRNAs do *cluster* foi observado que apenas o miR-17 teve impacto na sobrevida global dos pacientes ($p = 0,007$).

Adicionalmente, a análise multivariada revelou que o nível de expressão de miR-17 é um fator de prognóstico independente no LB (HR=3,68, $p=0,034$). Até o presente momento, somente um estudo avaliou o impacto do miR-17 no prognóstico do LB, mas em um número menor de casos de LB ($n=26$) tendo observado uma tendência para recaída nos casos com expressão aumentada (SCHIFFMAN JD *et al.*, 2011). Nossos dados refinam o mencionado estudo uma vez que além do nosso número de casos ser maior ($n=39$), a nossa análise ainda mostra que este fator tem prognóstico independente de outros fatores.

Tem sido proposto que o miR-17 desempenha um papel redundante durante a linfomagenese induzida por c-MYC visto que c-MYC promove a proliferação celular e a repressão transcricional de alvos relacionados com a inibição de proliferação entre os quais, p21 (CDKN1A) (OLIVE *et al.*, 2013). Um estudo, utilizando 30 amostras tumorais de LB pediátrico relatou ausência de expressão de p21 em todos os casos avaliados (LEVENTAKI *et al.*, 2012). Nossa hipótese aponta que o miR-17 pode aumentar a proliferação celular, através da inibição de p21, mas também reprime a tradução de BIM, inibindo a morte celular por apoptose, contribuindo para um prognóstico desfavorável no LB. Ressaltamos com base em nossas observações que a regulação da expressão do miR-17 pode ter um papel importante na resposta ao tratamento e desfecho clínico dos pacientes com LB pediátrico.

Além do *cluster* 17-92 outros miRNAs, como mencionado anteriormente, estão sob controle de c-MYC. A família miR-34 também foi objeto de nosso estudo. A perda de expressão dos miRNAs desta família tem sido demonstrada como bastante relevante na patogênese de vários tumores devido a sua correlação direta com p53 e c-MYC. (HEL L *et al.*, 2007). Na leucemia linfocítica crônica, baixos níveis de miR-34a foram correlacionados com mutação em *TP53* ou deleção 17p com impacto negativo no prognóstico (ASSLABER *et al.*, 2010). Além disso, no mieloma múltiplo também foi detectada baixa expressão de miR-34b/c devido a metilação do promotor desses miRNAs (WONG KY *et al.*, 2011). Mais recentemente, foi descrito mutação em *TP53* e metilação no miR34-a em pacientes com LDGC-B associadas a um desfecho clínico desfavorável (ASMAR *et al.*, 2014). Em relação ao LB, não há informações a respeito do impacto desta família na patogênese e no prognóstico dos pacientes. No entanto, foi observado que a baixa expressão do miR-34b é mais comum em pacientes com ausência da

translocação envolvendo *c-Myc* (LEUCCI *et al.*, 2008). Entretanto, no nosso estudo não observamos diferença nos níveis de miR-34b em relação a translocação de *c-Myc* ($p=0,456$). Essa discordância também foi encontrada em mais dois estudos (LENZE *et al.*, 2011; SALAVERRIA *et al.*, 2015). Em nosso estudo, a perda de expressão da família miR-34 foi um evento frequente no LB pediátrico. Os níveis médios de expressão relativa foram utilizados como ponto de corte para avaliar o impacto desses miRNAs na sobrevida global dos pacientes com LB. Esta análise mostrou que a expressão dos miRNAs da família miR-34 não teve associação com o prognóstico do LB pediátrico.

A restauração da expressão do miR-34 pode ser um importante indutor de apoptose, uma vez que a superexpressão do miR-34 re-estabelece as funções de p53, como apoptose e parada do ciclo celular (CHANG TC *et al.*, 2007). Alterações epigenéticas como a metilação do DNA têm sido associadas à inibição do miR-34b em diversos tipos de neoplasias, tais como: câncer oral, esôfago, colorretal, pulmão, mama, melanoma e, mais recentemente, foi relatada no LDGC-B (CHEN X *et al.*, 2012; KOZAKI K *et al.*, 2008; KUBO T *et al.*, 2011; LODYGIN D *et al.*, 2008; SUZUKI H *et al.*, 2010; ASMAR F *et al.*, 2014). No entanto, ainda é desconhecido o mecanismo de regulação do miR-34b no LB. No nosso estudo, nós aventamos a hipótese de que possa haver regulação negativa do miR-34b por metilação. Dessa forma, as linhagens de LB (Daudi, Raji, Namalwa e BL41) foram tratadas com agente demetilante e demonstramos que o tratamento resultou na alteração do nível de expressão do miR-34b nas linhagens de LB. Adicionalmente, Salaverria e colaboradores observaram metilação no promotor do miR-34b em amostras de LB independente da presença de translocação de *c-MYC*, bem como, nas linhagens Daudi e Raji também utilizadas no mesmo estudo (SALAVERRIA *et al.*, 2015). No presente estudo detectamos que o tratamento como agente demetilante promoveu uma diminuição de RNAm *c-MYC* nas linhagens Daudi e Raji. Um estudo realizado pelo nosso grupo encontrou uma frequência de 20% de mutação de *TP53* em pacientes com LB pediátrico no Brasil (KLUMB *et al.*, 2003). É possível supor que as funções de supressor tumoral do miR-34 podem ser restabelecidas apenas inibindo a metilação do mesmo, uma vez que a maioria dos pacientes com LB não apresentam mutação de p53.

A utilização de agentes demetilantes a fim de restaurar a expressão de miRNAs silenciados epigeneticamente tem levado a diminuição da expressão de alvos oncogênicos e, conseqüentemente, supressão do crescimento tumoral (LUJAMBIO A *et al.*, 2007; TOYOTA M *et al.*, 2008). Adicionalmente, vários estudos vêm sendo desenvolvidos com a utilização de miméticos do miR-34, relatando inibição do crescimento tumoral em modelos de câncer de pâncreas, pulmão e próstata *in vivo* (JI *et al.*, 2008; WIGGINS JF *et al.*, 2010). Com base nestes estudos, o miR-34a foi o primeiro miRNA a entrar em estudo clínico. O estudo de fase I está sendo conduzido em pacientes com câncer de fígado metastático através da administração do MRX34, mimético do miR-34a ligado a nanopartículas lipossomais (BOUCHIE A, *et al.*, 2013). Considerando a baixa expressão de miR-34 no LB demonstrada no presente estudo, e também em estudos anteriores, se for comprovada a eficácia dos miméticos miR-34a esta observação poderá também apontar para novas estratégias de tratamento no LB.

Em seqüência, nosso estudo foi avaliar o impacto da estabilização de c-MYC na expressão de miRNAs visto que a desregulação de c-MYC e de miRNAs contribui para as funções oncogênicas de c-MYC (JACKSTADT & HERMEKING, 2014). A transcrição gênica de *c-Myc* é ativada, rapidamente, por estímulos mitógenos (SPENCER & GROUDINE, 1990). Adicionalmente, a proteína c-MYC é rapidamente degradada, apresentando uma meia-vida muito curta, cerca de 20 minutos em células não transformadas (HANN & EISENMAN, 1984). A fosforilação da serina 62 (Ser62) de c-MYC pela via de MAP-ERK cinase promove a estabilização da proteína e proliferação celular. Por outro lado, a fosforilação da treonina 58 (Tre58) pela GSK3- β desestabiliza c-MYC levando a degradação via proteassoma (YEH *et al.*, 2004). Para esta investigação, as linhagens Daudi e Ramos foram tratadas com CHIR 99021, inibidor de GSK3 β afim de impedir a fosforilação da Tre58 de c-MYC, bloqueando a degradação de c-MYC. Após o tratamento com o inibidor observamos um acúmulo de c-Myc nas linhagens tratadas e, então, avaliamos se aumento nos níveis de c-MYC poderia alterar a expressão de miRNAs. Embora tenha ocorrido aumento no nível proteico de c-MYC nós não observamos uma alteração expressiva nos níveis de miRNAs na linhagem Ramos e Daudi.

Com a finalidade de certificar que os tempos analisados seriam suficientes para promover alterações nos níveis de expressão de miRNA, nós inibimos a transcrição de c-MYC e realizamos uma cinética de tempo após a remoção da inibição de c-MYC para avaliar a transcrição do *cluster* miR-17-92, utilizando a linhagem P493-6. Sendo assim, foi possível detectar que apenas 30 minutos são suficientes para as células aumentarem a transcrição de miRNAs. Com este ensaio, descartamos a hipótese de que os tempos analisados não seriam suficientes para promover uma alteração na expressão de miRNAs. No entanto, alterações na maquinaria de processamento dos miRNAs podem estar impedindo a ativação dos miRNAs por c-MYC. Em seguida investigamos se a inibição de GSK3 β poderia estar alterando a localização da Drosha. Esta hipótese teve como base a descrição de que a Drosha precisa ser fosforilada por GSK3 β para manter-se no núcleo (TANG *et al*, 2011).

A Drosha é uma endonuclease RNase tipo III primordial na biogênese dos miRNAs que atuam especificamente em RNA de fita dupla (dsRNA). O domínio c-terminal possui a atividade enzimática, sendo necessário para o processamento do pri-miRNA *in vitro*. Já o domínio amino-terminal é importante para a localização nuclear em células de mamíferos (HAN *et al*, 2004). Neste estudo, avaliamos a localização da Drosha e observamos uma diminuição de Drosha no núcleo ($p=0,004$) na linhagem Ramos exposta ao CHIR por 2 horas. Desse modo, nós constatamos que a inibição de GSK3 β teve como efeito a translocção da Drosha para o citoplasma na linhagem Ramos. Adicionalmente, foi descrito que em condições basais a GSK3 β fosforila Drosha nas serinas 300 e 302 *in vitro*, promovendo a localização nuclear da Drosha (TANG *et al.*, 2011). Com base nessa informação nós avaliamos a importância deste sítio, Ser300 e Ser302, na localização da Drosha e observamos que na presença da mutação na S300/302 a Drosha localiza-se predominantemente no citoplasma, sendo detectada uma diminuição da Drosha selvagem no compartimento nuclear em relação ao tratamento com CHIR. Assim, concluímos que a inibição de GSK3 β promove um acúmulo de c-MYC e altera a localização da Drosha, influenciando no processamento dos miRNAs.

Como conclusão geral, nosso estudo demonstrou pela primeira vez o perfil de expressão dos miRNAs: miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a e da família miR-34 no linfoma de Burkitt pediátrico. Adicionalmente, altos níveis de expressão do

miR-17 e do miR-20a foram correlacionados com a perda da expressão proteica de Bim. O papel da inibição de BIM pelo miR-17 foi confirmado através da inibição do miR-17 e detecção de aumento da proteína BIM em linhagem de LB. Além disso, os altos níveis de miR-17 apresentaram um impacto negativo no prognóstico e a análise multivariada revelou que o miR-17 é um fator de prognóstico independente de outras variáveis no LB. Com relação a família miR-34 não foi demonstrado impacto no prognóstico de pacientes com LB e aventamos a hipótese de que a metilação pode regular os níveis de miR-34 em linhagens de LB. Desse modo, nosso estudo mostrou a contribuição dos miRNA regulados por c-MYC na patogênese e prognóstico do LB pediátrico, apontado potenciais alvos terapêuticos para serem explorados nas pesquisas da terapia com miRNA.

7 CONCLUSÕES

- A expressão dos membros do *cluster* miR-17-92 é elevada e diferencialmente expressa nas amostras de LB pediátrico, e a diminuição dos níveis de miR-34 sugere o envolvimento destes miRNAs na patogênese do LB.
- A diferença de expressão de RNAm *c-MYC* em relação à presença ou ausência de translocação de *c-MYC* aponta para outros mecanismos de patogênese nos casos que não apresentam a translocação.
- A expressão dos miRNAs do *cluster* 17-92 pode ser afetada por outros mecanismos relacionados a sua biogênese e não tem relação direta com níveis de RNAm *c-MYC* em amostras de LB pediátrico.
- A associação entre altos níveis do miR-17 e do miR-20a com a expressão da proteína pró-apoptótica BIM reforça as observações de que BIM é alvo do miR-17 e do miR-20a.
- A observação de que o miR-17 é um fator de prognóstico independente de outras variáveis no LB pediátrico sugere a confirmação deste miRNA como marcador no LB.
- O agente demetilante de DNA, decitabina por regular os níveis de miR-34b e RNAm *c-MYC* em linhagens celulares de LB deve ser mais explorado em combinação com outras terapias.
- O efeito da estabilização protéica de *c-MYC* através da inibição de GSK3 β é complexo. A nossa observação de que a expressão dos miRNAs regulados por *c-MYC* em linhagens de LB não é alterada pela estabilização de *c-MYC* necessita futura investigação.
- A GSK3 β está envolvida nas vias que determinam a localização subcelular da proteína Drosha.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a fosforilação da Drosha mediante a utilização de CHIR (em andamento).
- Estabelecer um modelo de LB Drosha S300/302 mutante utilizando a ferramenta CRISPR-Cas9 para uma melhor compreensão do papel dos miRNAs na patogênese do LB (em andamento).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS BD, KASINSKI AL, SLACK FJ. **Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer.** *Current Biology*24, R762–R776, August 18, 2014.

ADHIKARY S, EILERS M. **Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* Aug;6(8):635-45. 2005.

ALTUVIA Y, LANDGRAF P, LITHWICK G, *et al.* **Clustering and conservation patterns of human microRNAs.** *Nucleic Acids Res* 33: 2697–2706. 2005.

AMBROSIO MR, NAVARI M, DI LISIO L, *et al.* **The Epstein Barr-encoded BART-6-3p microRNA affects regulation of cell growth and immuno response in Burkitt lymphoma.** *Infect Agent Cancer.* 14;9:12. Apr 2014.

ANDERSON, J.R., WILSON JF, JENKIN DT *et al.* **Childhood non-Hodgkin's lymphoma. The results of a randomized therapeutic trial comparing a 4-drug regimen (COMP) with a 10-drug regimen (LSA2-L2).** *New England Journal of Medicine,* 308: 559-565, 1983.

ANDERTON E, YEE J, SMITH P, *et al.* **Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma.** *Oncogene* 17;27(4):421-33. 2008.

ARAUJO I, FOSS HD, BITTENCOURT A, *et al.* **Expression of Epstein-Barr virus-gene products in Burkitt's lymphoma in Northeast Brazil.** *Blood.* 15;87(12):5279-86. 1996.

ASMAR F, HOTHER C, KULOSMAN G *et al.* **Diffuse large B-cell lymphoma with combined TP53mutation and MIR34Amethylation: Another “double hit” lymphoma with very poor outcome?** *Oncotarget,* Vol. 5, No. 7. 2014.

ASSLABER D, PIÑÓN JD, SEYFRIED I *et al.* **microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood.* May 27;115(21):4191-7. 2010.

BAHRAM F, VON DER LEHR N, CETINKAYA C, LARSSON LG. **c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover.** Blood. Mar 15;95(6):2104-10. 2000.

BAUMFORTH K, R.N. YOUNG LS, FLAVELL KJ *et al.* **The Epstein-Barr virus and its association with human cancers.** Molecular Pathology, 52(6):307-22, 1999.

BASSO K, SUMAZIN P, MOROZOV P *et al.* **Identification of the human mature B cell miRNome.** Immunity. May;30(5):744-52. 2009.

BEREZIKOV E. **Evolution of microRNA diversity and regulation in animals.** Nat Rev Genet. Nov 18;12(12):846-60. 2011.

BLACKWOOD EM1, EISENMAN RN. **Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc.** Science. Mar 8;251(4998):1211-7. 1991.

BLUM, K.A., LOZANSKI, G., BYRD, J.C. **Adult Burkitt leukemia and lymphoma.** Blood, 104:3009–3020, 2004.

BOMMER GT, GERIN I, FENG Y, *et al.* **p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes.** Curr Biol; 17: 1298–1307. 2007.

BORNKAMM G.W. **Epstein–Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: An unresolved issue Seminars in Cancer Biology. Seminars in Cancer biology** Volume 19, Issue 6, 351–365, December 2009.

BOUCHIE, A. **First microRNA mimic enters clinic.** Nat. Biotechnol. 31, 2013.

BOXER LM, DANG CV. **Translocations involving c-myc and c-myc function.** Oncogene. 10;20(40):5595-610. 2001.

BRADY G, MACARTHUR GJ, FARRELL PJ. **Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma.** Postgrad Med J. 84(993):372-7. 2008.

BRENNER C, DEPLUS R, DIDELOT C, LORIOT A, VIRÉ E., *et al.* **Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor.** EMBO J. Jan 26;24(2):336-46. Epub 2004 Dec 16. 2005.

BURKHARDT B., OSCHLIES I., KLAPPER W., *et al.* **Non-Hodgkin's lymphoma in adolescents: experiences in 378 adolescent NHL patients treated according to pediatric NHL-BFM protocols.** *Leukemia* 25, 153–160. 2011.

BURKITT, D. **A sarcoma involving the jaws in African children.** *British Journal of Surgery*, 46:218–223, 1958.

BURKITT DP. **The discovery of Burkitt's lymphoma.** *Cancer*. 51: 1777–1786. 1983.

CAIRO MS, GERRARD M, SPOSTO R. **Results of a randomized international study of high-risk central nervous system B non-Hodgkin lymphoma and B acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents.** *BLOOD*. 109:2736-2743. 2007.

CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, *et al.* **Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.** *Proc Natl Acad Sci USA*. Nov 26;99(24):15524-9. 2002.

CALIN GA; SEVIGNANI C; DUMITRU CD; *et al.* **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.** *PNAS*. 101(9): 2999-3004. 2004.

CAMPO E, SWERDLOW SH, HARRIS NL, PILERI S, STEIN H, JAFFE ES. **The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications.** *Blood*. 117(19): 5019–32. 2011

CANNELL IG, KONG YW, JOHNSTON SJ *et al.* **p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 107: 5375–5380. 2010.

CAI Q, MEDEIROS LJ, XU X, *et al.* **MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management.** *Oncotarget*, Vol. 6, No. 36, 2015.

CATUOGNO S, CERCHIA L, ROMANO G, *et al.* **miR-34c may protect lung cancer cells from paclitaxel-induced apoptosis.** *Oncogene*, 32:341– 351. 2013.

CHANG, TC; YU, D; LEE, Y-S; *et al.* **Widespread microRNAs repression by Myc contributes to tumorigenesis.** *Nature Genetics*. 40(1):43-50. 2008.

CHANG TC, WENTZEL EA, KENT OA, *et al.* **Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis.** *Mol Cell.* 26:745–752. 2007.

CHEN, CZ, LI, L, LODISH, HF, BARTEL, DP. **MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.** *Science.* 303, 83–86. 2004.

CHEN X, HU H, GUAN X *et al.* **CpG-island methylation status of miRNAs in esophageal squamous cell carcinoma.** *Int. J. Cancer.* 130(7), 1607–1613, 2012.

CHERNEY BW, BHATIA KG, SGADARI C, *et al.* **Role of the p53 tumor suppressor gene in the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma cells.** *Cancer Res.* 15;57(12):2508-15. 1995.

CHONG, M. M. *et al.* **Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery.** *Genes Dev.* 24, 1951–1960 2010.

CHRISTOFFERSEN NR, SHALGI R, FRANKEL LB, *et al.* **p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC.** *Cell Death Differ* 17:236–245. 2010.

CLARKE CA, UNDURRAGA D M., HARASTY O. J., *et al.* **Changes in cancer registry coding for lymphoma subtypes: reliability over time and relevance for surveillance and study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:630-638. April 13, 2006.

COLE KA, ATTIYEH EF, MOSSE YP *et al.* **A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene.** *Mol Cancer Res.* May;6(5):735-42. 2008.

COLLER HA, FORMAN JJ, LEGESSE-MILLER A. **"Myc'ed messages": myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron.** *PLoS Genet.* Aug;3(8):e146, 2007.

CRAIG VJ, TZANKOV A, FLORI M, *et al.* **Systemic microRNA-34a delivery induces apoptosis and abrogates growth of diffuse large B-cell lymphoma in vivo.** *Leukemia.* Nov;26(11):2421-4. 2012

DALLA-FAVERA R, BREGNI M, RIKSON J, *et al.* **Human c-myc one gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 79, pp. 7824-7827, December 1982.

DAVE SS, FU K, WRIGHT GW, *et al.* **Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma.** N Engl J Med 354:2431– 2442. 2006.

DE SOUZA MT, HASSAN R, LIEHR T, *et al.* **Conventional and molecular cytogenetic characterization of Burkitt lymphoma with bone marrow involvement in Brazilian children and adolescents.** Pediatr Blood Cancer. Aug;61(8):1422-6. 2014.

DEN HOLLANDER J, RIMPI S, DOHERTY JR, RUDELIUS M. *et al.* **Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state.** Blood. Sep 2; 116(9):1498-505. 2010.

DI LISIO L, SÁNCHEZ-BEATO M, GÓMEZ-LÓPEZ G. *et al.* **MicroRNA signatures in B-cell lymphomas.** Blood Cancer J. Feb;2(2):e57. 2012.

DIEBOLD, J. Burkitt lymphoma. In: Jaffe E, Harris N, Stein H *et al.*, eds. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** Washington, DC: IARC Press, 181–184, 2001.

EGLE A, HARRIS AW, BOUILLET P, CORY S. **Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia.** Proc Natl Acad Sci USA. Apr 20;101(16):6164-9. 2004.

EIS, PS; TAM, W; SUN, L; *et al.* **Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas.** PNAS. 102(10): 3627-3632. 2005.

EPSTEIN MA, BARR YM, ACHONG BG. **A second virus-carrying tissue culture strain (eb2) of lymphoblasts from burkitt's lymphoma.** Pathol Biol (Paris). Dec; 12:1233-4. 1964.

FABIAN MR, SONENBERG N, FILIPOWICZ W. **Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs.** Annu Rev Biochem. 79:351-79. 2010.

FABBRI M, GARZON R, CIMMINO A, *et al.* **MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B.** Proc Natl Acad Sci. 2007

FARRAGHER SM; TANNEY A; KENNEDY RD; *et al.* **RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues.** Histochem Cell Biol. 130:435-445. 2008.

FARRELL PJ, ALLAN GJ, SHANAHAN F, *et al.* **p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines.** EMBO J. 1991 October; 10(10): 2879–2887.

FERNANDEZ PC1, FRANK SR, WANG L, SCHROEDER M, *et al.* **Genomic targets of the human c-Myc protein.** *Genes Dev.* May 1;17(9):1115-29 2003.

FERREIRA AC, DE-FREITAS-JUNIOR JC, MORGADO-DÍAZ JA, RIDLEY AJ, KLUMB CE. **Dual inhibition of histone deacetylases and phosphoinositide 3-kinases: effects on Burkitt lymphoma cell growth and migration.** *J Leukoc Biol.* Nov 11 2015.

FERREIRA AC, ROBAINA MC, REZENDE LM, SEVERINO P, KLUMB CE. **Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt's lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101.** *Ann Hematol.* Jun;93(6):983-93. 2014.

FERRY, J.A. **Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis.** *The Oncologist*, 11:375-383, 2006.

GEMMA, L.K. & ALAN B.R. **Burkitt Lymphoma: Revising the Pathogenesis of a Virus-Associated Malignancy.** American Society of Hematology, Hematology 2007.

GONG, J.Z., STENZEL TT, BENNETT ER *et al.* **Burkitt lymphoma arising in organ transplant recipients: a clinicopathologic study of five cases.** *American Journal of Surgical Pathology*, 27:818–827, 2003.

GRANDORI C1, COWLEY SM, JAMES LP, EISENMAN RN. **The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior.** *Annu Rev Cell Dev Biol.*;16:653-99. 2000.

GREGORY MA, HANN SR. **c-Myc Proteolysis by the Ubiquitin-Proteasome Pathway: Stabilization of c-Myc in Burkitt's Lymphoma Cells.** *Mol Cell Biol.* Apr; 20(7): 2423–2435. 2000.

GUAN H, XIE L, KLAPPROTH K *et al.* **Decitabine represses translocated MYC oncogene in Burkitt lymphoma.** *J Pathol.* Apr; 229(5):775-83. 2013.

HARALAMBIEVA E, SCHUURING E, ROSATI S, *et al.* **Interphase fluorescence in situ hybridization for detection of 8q24/MYC breakpoints on routine histologic sections: Validation in burkitt lymphomas from three geographic regions.** *Genes, Chromosomes & Cancer.* 40:10–18, 2004.

- HAN, J. *et al.* **The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing.** *Genes Dev.* 18, 3016–3027 2004.
- HAN, J. *et al.* **Posttranscriptional cross regulation between Drosha and DGCR8.** *Cell* 136, 75–84 2009.
- HANN SR, EISENMAN RN. **Proteins encoded by the human c-myc oncogene: Differential expression in neoplastic cells.** *Mol Cell Biol* 4: 2486-2497. 1984.
- HASSAN R; KLUMB CE; FELISBINO FE; *et al.* **Clinical and demographic characteristics of Epstein-Barr virus-associated childhood Burkitt's lymphoma in Southeastern Brazil: epidemiological insights from an intermediate risk region.** *Haematologica.* 93(5):780-783. 2008.
- HAVELANGE, V. GARZON, R. **MicroRNAs: Emerging Key Regulators of Hematopoiesis.** *Am. J. Hematol.* 85, 935–942. 2010.
- HE L, HE X, LIM LP, *et al.* **A microRNA component of the p53 tumour suppressor network.** *Nature.* 447: 1130–1134. 2007.
- HE L, THOMSON JM, HEMANN MT. *et al.* **A microRNA polycistron as a potential human oncogene.** *Nature.* 124:1169-1181, 2005.
- HECHT JL & ASTER JC. **Molecular biology of Burkitt's lymphoma.** *J Clin Oncol.* v 1;18(21):3707-21, 2000.
- HEIM, S. & MITELMAN, F. **Malignant lymphomas.** In: Heim S, Mitelman F, eds. *Cancer Cytogenetic.* New York: Wiley-Liss, 266-309, 1995.
- HEMANN MT, BRIC A, TERUYA-FELDSTEIN J. **Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants.** *Nature.* 11;436(7052):807-11. 2005.
- HERMEKING H. **The miR-34family in cancer and apoptosis.** *Cell Death and Differentiation* 17,193–199. 2010.
- HOFFMAN B, LIEBERMANN DA. **Apoptotic signaling by c-MYC.** *Oncogene.* 27;27(50):6462-72. 2008.

HUANG H, ZHI-LIANG LIU, HUA ZENG, *et al.* **Clinicopathological Study of Sporadic Burkitt Lymphoma in Children.** Chinese Medical Journal. Volume 128, Issue 4, February 20, 2015.

HUNGERFORD DA, HUNGERFORD AM. **Chromosome structure and function in man. VI. Pachytene chromomere maps of 16, 17 and 18; pachytene as a reference standard for metaphase banding.** Cytogenet Cell Genet.;21(4):212-30, 1978.

HUMMEL M, BENTINK S, BERGER H *et al.* **A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling.** N Engl J Med 354:2419–2430. 2006.

IQBAL J, SHEN Y, HUANG X, *et al.* **Global microRNA expression profiling uncovers molecular markers for classification and prognosis in aggressive B-cell lymphoma.** Blood.;125(7):1137-45. 2015

JACKSTADT R & HERMEKING H. **MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function.** Biochim. Biophys. Acta. 2014.

JAFFE ES, DIEBOLD J, HARRIS NL, *et al.* **Burkitt's lymphoma: a single disease with multiple variants. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues.** Blood. 1;93(3):1124. 1999.

JAFFE ES. **The 2008 who classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program.523-31. 2009.

JI M, RAO E, RAMACHANDRAREDDY H *et al.* **The miR-17-92 microRNA cluster is regulated by multiple mechanisms in B-cell malignancies.** Am J Pathol. Oct;179(4):1645-56, 2011.

JI Q, HAO X, MENG Y, *et al.* **Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres.** BMC Cancer; 8: 266, 2008.

JUNTTILA MR, WESTERMARCK J. **Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies.** Cell Cycle. Mar 1;7(5):592-6. 29. 2008.

JURISIC V, RADENKOVIC S, KONJEVIC G. **The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects.** *Advances in Cancer Biomarkers, Advances in Experimental Medicine and Biology* 867, 2015.

LAI M, XIAO C. **Functional interactions among members of the miR-17-92 cluster in lymphocyte development, differentiation and malignant transformation.** *International immunopharmacology.* doi:10.1016/j.intimp.2015.03.041. 2015.

KIM VN. **Small RNAs: classification, biogenesis, and function.** *Mol Cells.* Feb 28;19(1):1-15. 2005.

KLAPPROTH, K; WIRTH, T. **Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis.** *British Journal of Haematology.* 149: 484-497. 2010.

KLEIN G. **EBV-B cell interactions: immortalization, rescue from apoptosis, tumorigenicity (a short review).** *Acta Microbiol Immunol Hung.*43(2-3):97-105. 1996.

KLUMB CE, HASSAN R, DE OLIVEIRA DE, *et al.* **Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil.** *Int J Cancer.* 1;108(1):66-70, 2003.

KLUMB CE, RESENDE LMM, TAJARA EH, *et al.* **p53 gene analysis in childhood B non -Hodgkin's lymphoma.** *Sao Paulo Med J/Rev Paul Med* 2001.

KLUMB, C.E. SCHRAMM MT, DE RESENDE LMM, *et al.* **Treatment of children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in developing countries: the experience of a single center in Brazil.** *Journal of Pediatric Hematology/Oncology,* 26 (7):462-8, 2004.

KOZAKI K, IMOTO I, MOGI S, OMURA K, INAZAWA J. **Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer.** *Cancer Res.* Apr 1;68(7):2094-105. 2008.

KNOWLES, D.M. **Etiology and pathogenesis of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma.** *Hematology/Oncology Clinics of North America,* 17:785–820, 2003.

KONG YW, CANNELL IG, DE MOOR CH *et al.* **The mechanism of micro-RNA mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene.** *Proc Natl Acad Sci* 105:8866–8871. 2008.

- KORALOV S.B. MULJO S.A. GALLER, G.R. *et al.* **Dicer Ablation Affects Antibody Diversity and Cell Survival in the B Lymphocyte Lineage.** *Cell* 2008, 132, 860–874.
- KUBO T, TOYOOKA S, TSUKUDA K *et al.* **Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma.** *Clin Cancer Res.* Aug 1;17(15):4965-74. 2011.
- LAEMMLI UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* Aug 15;227(5259):680-5. 1970.
- LAWRIE, C.H. **MicroRNAs and lymphomagenesis: A functional review.** *Br. J. Haematol.* 160, 571–581. 2013.
- LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.** *Cell.* Dec 3;75(5):843-54. 1993.
- LENZE D, LEONCINI L, HUMMEL M, *et al.* **The different epidemiologic subtypes of Burkitt lymphoma share a homogenous micro RNA profile distinct from diffuse large B-cell lymphoma.** *Leukemia.*;25(12):1869-1876, 2011.
- LEVENTAKI V, RODIC V, TRIPP SR, *et al.* **TP53 pathway analysis in paediatric Burkitt lymphoma reveals increased MDM4 expression as the only TP53 pathway abnormality detected in a subset of cases.** *British journal of haematology.* 158(6):763-71. 2012.
- LEUCCI E., COCCO M., ONNIS A. *et al.* **MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation.** *J Pathol.* 216: 440–450; 2008.
- LI, X; ABDEL-MAGEED, AB; MONDAL, D; *et al.* **MicroRNA expression profiles in differentiated thyroid cancer, a review.** *Int J Clin Exp Med.* 6(1):74-80.2013.
- LIN CY, LOVÉN J, RAHL PB, PARANAL RM. **Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc.** *Cell.* Sep 28; 151(1):56-67. 2012.
- LIN, J. LWIN, T. ZHAO, J.J *et al.* **Follicular dendritic cell-induced microRNA-mediated upregulation of PRDM1 and down-regulation of BCL-6 in non-Hodgkin's B-cell lymphomas.** *Leukemia,* 25, 145–152. 2011.

- LINCH DC. **Burkitt lymphoma in adults.** Br J Haematol. 156(6):693-703. 2012.
- LINDSTROM MS, KLANGBY U and WIMAN KG. **P14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53.** Oncogene 20, 2171-2177, 2001.
- LODYGIN D, TARASOV V, EPANCHINTSEV A, *et al.* **Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer.** Cell Cycle. 7:2591–2600. 2008.
- LONES MA, SANGER WG, LE BEAU MM, *et al.* **Children's Cancer Group Study CCG-E08 Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: A report from children's cancer group study CCG-E08.** Journal of Pediatric hematology/oncology 26:169–178, 2004.
- LOPEZ-SERRA P AND ESTELLER M. **DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer.** Oncogene. Mar 29;31(13):1609-22. 2012.
- LOVE C, SUN Z, JIMA D, LI G, ZHANG J. *et al.* **The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma.** Nat Genet. Dec; 44(12):1321-5. 2012.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J Biol Chem. Nov;193(1):265-75. 1951.
- LUJAMBIO A, CALIN GA, VILLANUEVA A, *et al.* **A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis.** Proc Natl Acad Sci USA. 105:13556-61. 2008.
- LYONS SF, LIEBOWITZ DN. **The roles of human viruses in the pathogenesis of lymphoma.** Semin Oncol.25(4):461-75. 1998.
- MACHADO ASC., APA AG., REZENDE, LMM., *et al.*, **Plasma Epstein-Barr viral load predicting response after chemotherapy for post-transplant lymphoproliferative disease.** Clinical and Experimental Medicine, 8:129-132, 2008.
- MACHADO ASC; ROBAINA MCS; REZENDE LM; *et al.* **Circulating cell-free and Epstein Barr virus DNA in pediatric B non-Hodgkin lymphomas.** Leukemia and Lymphoma. 51: 1020-1027. 2010.

- MACFARLANE LA, MURPHY PR. **MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.** *Curr Genomics.* Nov;11(7):537-61. 2010.
- MAGRATH, I.T. **Clinical features and management of NLHs.** In: Magrath IT, eds. *The non-Hodgkin's lymphomas.* London: Arnold, 778-810, 1997.
- MANET, E., BOURILLOT PY, WALTZER L, et al. **EBV genes and B cell proliferation.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology,* 28:129-37, 1998.
- MARUYAMA R, SUZUKI H. **Long noncoding RNA involvement in cancer.** *BMB Rep.* Nov. 45(11):604-11. 2012.
- MEDINA PP, NOLDE M, SLACK FJ. **OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma.** *Nature.* Sep 2;467(7311):86-90. 2010.
- MERKEROVA, M.; BELICKOVA, M.; BRUCHOVA, H. **Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages.** *Eur. J. Haematol.* 81, 304–310. 2008.
- MESTRE-ESCORIHUELA C, RUBIO-MOSCARDO F, RICHTER JA, *et al.*, **Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas.** *Blood.* 1;109(1):271-80. 2007
- METZLER M, WILDA M, BUSCH K, VIEHMANN S, BORKHARDT A. **High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma.** *Genes Chromosomes Cancer.* Feb;39(2):167-9. 2004.
- MEYER N, KIM SS, PENN LZ. **The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis.** *Semin Cancer Biol.* 16(4):275-87. 2006.
- MEYERSON M, HARLOW E. **Identification of G1kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner.** *Mol Cell Biol* 14:2077–2086. 1994.
- MICHLEWSKI G, GUIL S, SEMPLÉ CA, CÁ CERES JF. **Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops.** *Mol Cell.* Nov 7;32(3):383-93, 2008.
- MILES RR, ARNOLD S, CAIRO MS. **Risk factors and treatment of childhood and adolescent Burkitt lymphoma/leukaemia.** *British Journal of Haematology.* 156, 730–743. 2012.

- MINNICELLI C, BARROS MH, KLUMB CE. **Relationship of Epstein-Barr virus and interleukin 10 promoter polymorphisms with the risk and clinical outcome of childhood Burkitt lymphoma.** PLoS One. 7(9):46005. 2012.
- MITCHELL RN, KUMAR V, FAUSTO N, ABBAS AK. **Robbins & Cotran, Patologia - Bases Patológicas das Doenças - 7ª Edição.** Editora Elsevier 2005.
- MISSO G, DI MARTINO MT, DE ROSA G et al. **Mir-34: A New Weapon Against Cancer?** Molecular Therapy—Nucleic Acids 3, 194. 2014.
- MOLETI ML, TESTI AM, GIONA F, *et al.* **CODOX-M/IVAC (NCI 89-C-41) in children and adolescents with Burkitt's leukemia/lymphoma and large B-cell lymphomas: A 15-year monocentric experience.** Leukemia & Lymphoma, Vol. 48, No. 3, 551-559. 2007.
- MOLINA-PRIVADO I, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ M, REBOLLO P *et al.* **E2F1 expression is deregulated and plays an oncogenic role in sporadic Burkitt's lymphoma.** Cancer Res. May 1;69(9):4052-8. 2009.
- NEILSON JR, ZHENG GX, BURGE CB, *et al.* **Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development.** Genes Dev. 21, 578–589. 2007.
- NELSON M, SHERRIE L. PERKINS, *et al.* **An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG-5961.** Br J Haematol. Feb;148(4):600-10 2011.
- NIE K, GOMEZ M., LANDGRAF P. *et al.* **MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: A potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas.** Am. J. Pathol. 2008, 173, 242–252.
- NIE, K.; ZHANG, T.; ALLAWI, H. *et al.* **Epigenetic down-regulation of the tumor suppressor gene PRDM1/Blimp-1 in diffuse large B cell lymphomas: A potential role of the microRNA let-7.** Am. J. Pathol. 2010, 177, 1470–1479.
- NOGAI H., DO'RKEN B., AND LENZ G. **Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma.** Journal of Clinical Oncology. 29:1803-1811, 2011.

O'CONNOR L, STRASSER A, O'REILLY *et al.* **Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis.** EMBO J. 15; 172):384-95. 1998.

OLIVE V, BENNETT MJ, WALKER JC, *et al.* **miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92.** Genes Dev 23:2839-2849. 2009.

OLIVE V, SABIO E, BENNETT MJ, *et al.* **A component of the mir-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis.** eLife.;2:e00822. 2013.

OLIVEIRA FERREIRA JM, KLUMB CE, REIS RS, *et al.* **Lymphoma subtypes incidence rates in children and adolescent: first report from Brazil.** Cancer Epidemiology, 2012.

OLSEN PH, AMBROS V. **The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation.** Dev Biol. Dec 15;216(2):671-80. 1999.

ONCIU M, SCHLETTE E, ZHOU Y, *et al.* **Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high-stage burkitt lymphoma.** Cancer. 107:1084-1092. 2006.

ONNIS A, DE FALCO G, ANTONICELLI G *et al.* **Alteration of microRNAs regulated by c-Myc in Burkitt lymphoma.** PLoS One. Sep 24;5(9). 2010.

ONNIS A, NAVARI M, ANTONICELLI G *et al.* **Epstein-Barr nuclear antigen 1 induces expression of the cellular microRNA hsa-miR-127 and impairing B-cell differentiation in EBV-infected memory B cells. New insights into the pathogenesis of Burkitt lymphoma.** Blood Cancer J. 2:e84. 2012

O'NIONS J, ALLDAY MJ. **Epstein-Barr virus can inhibit genotoxin-induced G1 arrest downstream of p53 by preventing the inactivation of CDK2.** Oncogene. 16;22(46):7181-91. 2003.

OKAMURA, K; CHUNG, WJ; LAI, EC. **The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs.** Cell Cycle. 7(18):2840-2845. 2008.

- OREM J, MBIDDE EK, WEIDERPASS E. **Current investigations ant treatment of Burkitt's lymphoma in Africa.** Trop Doct 38: 7-11, 2008.
- OSTHUS RC1, SHIM H, KIM S, LI Q, REDDY R. *et al.*, **Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc.** J Biol Chem. 2000 Jul 21;275(29):21797-800.
- OTA A, TAGAWA H, KARNAN S, *et al.* **Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma.** Cancer Res. 2004;64:3087-3095.
- PACKHAM G, CLEVELAND JL. **c-Myc and apoptosis.** Biochim Biophys Acta. 28;1242(1):11-28. 1995.
- PAJIC A, SPITKOVSKY D, CHRISTOPH B. **Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line.** Int J Cancer. Sep 15;87(6):787-93. 2000.
- PASCHOS K, SMITH P, ANDERTON E, *et al.* **Epstein-barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumour suppressor gene Bim.** PLoS Pathog. 5(6):2009.
- POIREL HA, CAIRO MS, HEEREMA NA, *et al.* **Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-hodgkin's lymphoma: Results of the FAB/LMB 96 international study.** Leukemia Feb;23(2):323-31, 2009.
- PATTE, C. **Non-Hodgkin's lymphoma.** European Journal of Cancer, 34:359-362, 1998.
- PATTE, C. **Treatment of mature B-ALL and high grade B-NHL in children.** Best Practice & Research. Clinical Haematoly, Review, 15 (4):695-711, 2003.
- PATTE C, AUPERIN A, MICHON J., *et al.* **The Société Française d'Oncologie Pédiatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia.** Blood. 97(11):3370-9. 2001.
- PATTE C., AUPERIN A., GERRARD M., *et al.* **Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin**

lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood.* 109(7): 2773–2780, 2007.

PASCHOS K, SMITH P, ANDERTON E, *et al.* **Epstein-barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumour suppressor gene Bim.** *PLoS Pathog.* 5(6):2009.

PSATHAS JN, TIKHONENKO AT. **MYC and the Art of MicroRNA Maintenance.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014.

POWLES T, MATTHEWS G, BOWER M. **AIDS related systemic non-Hodgkin's lymphoma.** *Sex Transm Infect.*76(5):335-41. 2000.

PRENDERGAST GC1, ZIFF EB. **Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region.** *Science.* Jan 11;251(4990):186-9. 1991.

REITER A, SCHRAPPE M, PARWARESCH R. *et al.* **Non-Hodgkin's lymphomas of childhood and adolescence: results of a treatment stratified for biologic subtypes and stage--a report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group.** *J Clin Oncol.* 13(2):359-72. 1995.

REITER A, SCHRAPPE M, TIEMANN M, *et al.* **Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90.** *Blood.* 15;94(10):3294-306. 1999.

ROBAINA MC, FACCION RS, ARRUDA VO, DE REZENDE LM, VASCONCELOS GM, APA AG, BACCHI CE, KLUMB CE. **Quantitative analysis of CDKN2A methylation, mRNA, and p16(INK4a) protein expression in children and adolescents with Burkitt lymphoma: biological and clinical implications.** *Leuk Res.* Feb;39(2):248-56. 2015.

ROBERTUS JL, KLUIVER J, WEGGEMANS C, *et al.* **MiRNA profiling in B non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma.**

SALAVERRIA I, ZETTL A, BEA S, *et al.* **Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP). Chromosomal alterations detected by comparative**

genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined burkitt's lymphoma. Haematologica. 93:1327–1334. 2008.

SAMPSON VB, RONG NH, HAN J. *et al.* **MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells.** Cancer Res. Oct 15;67(20):9762-70. 2007.

SAND, M; SAND, D; ALTMAYER, P; *et al.* **MicroRNA in non-melanoma skin cancer.** Cancer Biomarkers. 11:253-257. 2012.

SANDER S, CALADO D. P, SRINIVASAN L, *et al.* **Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis.** Cancer Cell 22, 167–179. 2012.

SANDLUND JT, DOWNING JR, CRIST WM. **Non-Hodgkin's lymphoma in childhood.** N Engl Journal Med. 334;1238-48, 1996.

SANDLUND JT, ROBERTS WM, PUI CH, *et al.* **Systemic hemophagocytosis masking the diagnosis of large cell non-Hodgkin lymphoma.** Med Pediatr Oncol. (3):167-9. 1997.

SARKIES, P; SALE, JE. **Cellular epigenetic stability and cancer.** Trends Genet. 28(3):118-27. 2010.

SCHERR M, ELDER A, BATTMER K *et al.* **Differential expression of miR-17~92 identifies BCL2 as a therapeutic target in BCR-ABL-positive B-lineage acute lymphoblastic leukemia.** Leukemia. Mar;28(3):554-65. 2014.

SCHIFFMAN, JD. LORIMER PD, RODIC V, *et al.* **Genome wide copy number analysis of paediatric Burkitt lymphoma using formalin-fixed tissues reveals a subset with gain of chromosome 13q and corresponding miRNA over expression.** British Journal of Haematology, 155, 477-486, 2011.

SEARS RC. **The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation.** Cell Cycle. 3(9):1133-7. 2004.

SCHMITZ R, YOUNG R. M, CERIBELLI M. *et al.* **Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics.** Nature 490, 116–120. 2012.

SCHMITZ R, CERIBELLI M, PITTALUGA S, WRIGHT G, STAUDT LM. **Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma.** Cold Spring Harb Perspect Med. 2014.

- SEWASTIANIK T, PROCHOREC-SOBIESZEK M, CHAPUY B, JUSZCZYŃSKI P. **MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications.** *Biochim Biophys Acta.* Sep 6;1846(2):457-467. 2014.
- SHEINESS D, BISHOP JM. **DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus.** *J Virol.* 1979 Aug;31(2):514-21.
- SHIM H, DOLDE C, LEWIS BC *et al.* **c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(13):6658-63. 1997.
- SHIRAMIZU B, BARRIGA F, NEEQUAYE J, *et al.* **Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association.** *Blood,* 77:1516-26, 1991.
- SMITH SM1, ANASTASI J, COHEN KS, GODLEY LA. **The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma.** *Blood Cells Mol Dis.* Dec 15;45(4):317-23. doi: 10.1016/j.bcnd.2010.08.002. Epub 2010 Sep 6. 2010.
- SOTILLO E, LAVER T, MELLERT H, *et al.* **Myc overexpression brings out unexpected antiapoptotic effects of miR-34a.** *Oncogene*30:2587–2594. 2011.
- SOUCEK L, EVAN GI. **The ups and downs of Myc biology.** *Curr Opin Genet Dev.* 2010 Feb;20(1):91-5.
- SPENCER CA, GROUDINE M. **Molecular analysis of the c-Myc transcription elongation block. Implications for the generation of Burkitt's lymphoma.** *Ann NY Acad Sci.* 599: 12-28, 1990.
- STEINER MS, WANG Y, ZHANG Y, ZHANG X, LU Y. **p16/MTS1/INK4A suppresses prostate cancer by both pRb dependent and independent pathways.** *Oncogene.* 2000 Mar 2;19(10):1297-306.
- SUZUKI H, YAMAMOTO E, NOJIMA M, *et al.* **Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect.** *Carcinogenesis.* Dec;31(12):2066-73. 2010.

SYLVESTRE Y1, DE GUIRE V, QUERIDO E. *et al.* **An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop.** J Biol Chem. 2007 Jan 26;282(4):2135-43.

TANG, X., LI, M., TUCKER, L. & RAMRATNAM, B. **Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) phosphorylates the RNAase III enzyme Drosha at S300 and S302.** PLoS ONE 6, e20391 2011.

TANG, X. *et al.* **Acetylation of drosha on the N-terminus inhibits its degradation by ubiquitination.** PLoS ONE 8, e72503 2013.

TAGAWA H, SETO M. **A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma.** Leukemia. 2005;19:2013-2016.

TAUB, R., KIRSCH, I., MORTON, C., LENOIR, G., *et al.* **Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells.** Proc. Natd Acad. Sci. USA 79, 7837-7841.1982.

TAZAWA H, TSUCHIYA N, IZUMIYA M, NAKAGAMA H. **Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells.** Proc Natl Acad Sci104: 15472– 15477. 2007.

TOYOTA M, SUZUKI H, SASAKI Y, *et al.* **Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer.** Cancer Res2008;68: 4123–4132.

TULLIO GD, FAZIO V, SGHERZA N., *et al.* **Challenges and Opportunities of MicroRNAs in Lymphomas.** Molecules 2014, 19, 14723-14781

VAN DEN BOSCH CA. **Is endemic Burkitt's lymphoma an alliance between three infections and a tumour promoter?** Lancet Oncol. 5(12):738-46 Dec 2004.

VENTURA A, YOUNG AG, WINSLOW MM, *et al.* **Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters.** Cell132:875–886. 2008

VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG *et al.* **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.** Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 2257–

61

VOUSDEN KH, PRIVES C. **P53 and prognosis: new insights and further complexity.** Cell. 14;120(1):7-10. 2005.

WANG, F; SUN, G-P; ZOU, Y-F; *et al.* **MicroRNAs as promising biomarkers for gastric cancer.** Cancer Biomarkers. 11:259-267. 2012.

WIELS, J. LENOIR GM, FELLOUS M. *et al.* **A monoclonal antibody with anti-Burkitt lymphoma specificity. I. Analysis of human haematopoietic and lymphoid cell lines.** International Journal of Cancer, 29:653-8, 1982.

WIGGINS JF, RUFFINO L, KELNAR K, *et al.* **Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34.** Cancer Res; 70: 5923–5930, 2010.

WOODS K, THOMSON JM, HAMMOND SM **Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors.** J Biol Chem. 2007 Jan 26;282(4):2130-4.

WONG KY, YIM RLH, SO CC, *et al.* **Epigenetic inactivation of the MIR34B/C in multiple myeloma.** Blood 2011; 118: 5901–5904

XICOY B, ESTEVE J. *et al.* **Post-transplant Burkitt's leukemia or lymphoma. Study of five cases treated with specific intensive therapy (PETHEMA ALL-3/97 trial).** Leukemia & Lymphoma, 44:1541–1543, 2003.

XIAO C, SRINIVASAN L, CALADO DP, *et al.* **Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17– 92 expression in lymphocytes.** Nat Immunol 9:405–414. 2008.

XIONG L, JIANG W, ZHOU R, MAO C, GUO Z. **Identification and analysis of the regulatory network of Myc and microRNAs from high-throughput experimental data.** Comput Biol Med. Sep;43(9):1252-60. 2013.

YAMAKUCHI M, FERLITO M, LOWENSTEIN CJ. **miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis.** Proc Natl Acad Sci USA; 105: 13421–13426. 2008.

YEH E, CUNNINGHAM M, ARNOLD H, *et al.* **A signaling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells.** Nat Cell Biol 6: 308-318. 2004.

YU J, WANG F, YANG GH, *et al.* **Human microRNA clusters: Genomic organization and expression profile in leukemia cell lines.** *Biochem Biophys Res Commun* 349: 59–68. 2006.

LI Y, CHOI PS, CASEY SC, DILL DL, FELSHER DW. **MYC through miR-17-92 Suppresses Specific Target Genes to Maintain Survival, Autonomous Proliferation, and a Neoplastic State.** *Cancer Cell* 26, 262–272, August 11, 2014.

ZAMORE PD, HALEY B. **Ribo-gnome: the big world of small RNAs.** *Science*. Sep 2;309(5740):1519-24. 2005

ZELLER KI, ZHAO X, LEE CW. *et al.* **Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells.** *Proc Natl Acad Sci* 103: 17834-17839. 2006.

ZHANG X; ZHAO X; FISKUS W; *et al.* **Coordinated silencing of MYC-Mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive b-cell lymphomas.** *Cell*. 2012.

10 Anexos

10.1 Trabalho científico publicado referente à tese de doutorado

ROBAINA MC, FACCION RS, MAZZOCCOLI L, REZENDE LM, QUEIROGA E, BACCHI CE, THOMAS-TIKHONENKO A, KLUMB CE. **miR-17-92 cluster components analysis in Burkitt lymphoma: overexpression of miR-17 is associated with poor prognosis.** *Ann Hematol.* 2016 Apr 5. *Online*

Ann Hematol
DOI 10.1007/s00277-016-2653-7



ORIGINAL ARTICLE

miR-17-92 cluster components analysis in Burkitt lymphoma: overexpression of miR-17 is associated with poor prognosis

Marcela Cristina Robaina^{1,4} · Roberta Soares Faccion¹ · Luciano Mazzoccoli¹ · Lidia Maria M. Rezende² · Eduardo Queiroga³ · Carlos E. Bacchi³ · Andrei Thomas-Tikhonenko^{4,5} · Claudete Esteves Klumb^{1,6}

Received: 15 March 2016 / Accepted: 22 March 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Burkitt lymphoma (BL) is an aggressive B cell lymphoma characterized by the reciprocal translocation of the *c-Myc* gene with immunoglobulin genes. Recently, MYC has been shown to maintain the neoplastic state via the miR-17-92 microRNA cluster that suppresses chromatin regulatory genes and the apoptosis regulator Bim. However, the expression and prognostic impact of miR-17-92 members in pediatric BL (pBL) are unknown. Therefore, we investigated miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20, and miR-92a expression and prognostic impact in a series of 41 pBL samples. In addition, Bim protein expression was evaluated and compared to miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20, and miR-92a levels and patient outcomes. The expression of miR-17-92 members was evaluated by qPCR and Bim protein by immunohistochemistry. Log-rank test was employed to assess prognostic

impact. We found that upregulated expression of miR-17 and miR-20a correlates with lack of pro-apoptotic Bim expression. Patients bearing tumors with upregulated miR-17 displayed decreased overall survival (OS), and multivariate analysis revealed that miR-17 was a significant predictor of shortened OS. Using hairpin inhibitors, we showed that inhibition of miR-17 resulted in enhanced Bim expression in a BL cell line overexpressing the miR-17-92 cluster. Our results describe for the first time miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a expression profiles in pBL. The prognostic impact of miR-17 should be validated in a larger series, and may provide new therapeutic avenues in the era of anti-miRNA therapy research. Additional functional studies are further required to understand the specific role of miR-17-92 cluster members in BL.

Keywords Burkitt lymphoma · miR-17-92 cluster · MYC · Bim · miR-17 and miR-20a family · Prognosis

✉ Claudete Esteves Klumb
eklumb@inca.gov.br

¹ Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

² Divisão de Patologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

³ Consultoria em Patologia, Botucatu, São Paulo, Brazil

⁴ Division of Cancer Pathobiology, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA

⁵ Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

⁶ Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Praça da Cruz Vermelha, 23, 6th floor, Rio de Janeiro, RJ CEP: 20230-130, Brazil

Introduction

The protein c-MYC (MYC), the product of the oncogene *c-Myc*, is a key transcription factor in the regulation of B cell development by repressing and activating genes that are involved in various cellular processes such as cell cycle progression, apoptosis, protein biosynthesis, and metabolism [1–3]. MYC expression is strictly regulated by feedback mechanisms [4]. Recent reports indicate that MYC is involved in the regulation of microRNAs (miRNAs) [5]. In addition, miRNAs regulate MYC expression, suggesting the presence of a regulatory loop between MYC and miRNAs [6].

miRNAs are small non-coding RNAs of approximately 20–24 nucleotides that alter the expression of gene targets

Published online: 05 April 2016



involved in various biological processes including those related to B cell development [7, 8]. In malignant B cell diseases, miRNAs have emerged as critical regulators of signal transduction pathways, anti- and pro-apoptotic proteins, and transcription factors [9, 10] by repressing translation or accelerating messenger RNA (mRNA) decay [7]. Some miRNAs are not found in the genome as a single gene but rather as multiple miRNAs in a cluster [11]. This polycistronic gene structure is common among important miRNAs. The first identified MYC-regulated miRNA cluster was miR-17-92 [3]. Typically, miRNA clusters encode two or three miRNAs. However, the miR-17-92 cluster encodes six mature miRNAs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, and miR-92a) [12]. These six miRNA components belong to four miRNA families: miR-17 and 20, miR-18, miR-19 (19a and 19b), and miR-92. These miRNAs form a polycistronic structure that is transcribed as a pri-miRNA individual sequence, and they are processed separately to form individual mature miRNAs. The sequence of each miRNA family determines the specificity of the target genes that they regulate, resulting in diverging biological effects in different cell types. Moreover, the polycistronic structure allows for the expansion of the gene regulatory capacity and may be associated with functional interactions among distinct family members [13].

Overexpression of the miR-17-92 cluster has been described in several types of tumors but is predominant among hematological malignancies including Burkitt lymphoma (BL) [14]. The identification of miR-17-92 target genes revealed two tumor suppressors, *Pten* and *Bim* [15–17]. The repression of PTEN phosphatase and pro-apoptotic BH3-only protein BCL2L11 (BCL2 interacting mediator of cell death, Bim) was confirmed in lymphocytes from miR-17-92 transgenic mice, which display increased proliferation and reduced activation-induced cell death leading to lymphoproliferative disease [15]. BL is an aggressive B cell lymphoma characterized by the reciprocal translocation of the *c-Myc* gene with the immunoglobulin-heavy chain gene $t(8;14)(q24;q32)$, or one of the light chain genes (22q11 or 2p12), leading to deregulated expression of the oncogenic transcription factor MYC [18] and miRNAs under MYC regulation [19]. Notably, a recent study established that MYC maintains a neoplastic state via the miR-17-92 cluster that suppresses chromatin regulatory genes and the apoptosis regulator Bim [20]. These observations prompted us to investigate the expression and prognostic impact of miR-17-92 members, namely miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20, and miR-92a levels in 41 pediatric BL (pBL) cases. In addition, Bim protein expression levels were also evaluated and then compared to miR-17-92 members' expression profile, MYC levels, and patient outcomes to better understand the role of MYC and miR-17-92 cluster in pBL.

Material and methods

Patient samples

Forty-one formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples of pBL from the Hematology Service of the National Cancer Institute, Brazil, were included in the study. Cases were selected according to the availability of FFPE tissue samples for molecular studies. BL diagnosis was confirmed according to the criteria described by the 2008 World Health Organization (WHO) classification for hematopoietic diseases based on morphological criteria (histopathological diagnosis was confirmed by a second pathologist, L.M.R.), immunohistochemical profile (expression of CD20, CD10, and Bcl6, high proliferation rate with ki-67 near 100 %, and absent or weak Bcl2 expression), and the analysis of *c-MYC* translocation by fluorescence in situ hybridization (FISH) [21]. All pBL cases with available diagnostic tissue samples were selected for the study. The upper limit age was 18 years. Patient staging followed the St. Jude Children's Research Hospital Staging System (stages I–IV) [22]. Patients were treated with the NHL-BFM 86/90 (Berlin–Frankfurt–Munster)-based protocol [23]. Follow-up data were obtained from patients' medical records. The study was approved by the institutional ethics committee (registration number 18/09), in accordance with the Declaration of Helsinki.

EBV detection by ISH

The Epstein–Barr virus (EBV) status was assessed by in situ hybridization (ISH) for EBV-encoded RNA (EBER) with a biotinylated probe for EBER-1 (0.25 ng/mL final concentration). For controls were selected two cases of BL previously known to be EBV-positive and EBV-negative as previously described [24, 25]. The assay was performed using tissue microarray (TMA) slides. The TMA was assembled by selecting representative tumor areas of each tumor. The selected area of the tissue was fixed in a paraffin block called "recipient block" through the use of a tissue microarrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). The diameter of each sample was added with 2.0 mm spacing in the x-axis and y-axis with 3.0 mm.

FISH

FISH analysis of 24 tumor samples was performed on TMA slides as previously described [25]. Due to tissue loss on the TMAs, routine histological sections were used for FISH analysis in the other 17 cases.

RNA extraction and real-time PCR of Myc mRNA, miR-17, miR-20a, and miR-92a

The RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE tissue samples (Ambion®) was used to isolate the mRNA and miRNAs from BL samples according to the manufacturer's instructions. Eight reactive lymph node tissue specimens were used as reference samples. To assess the purity of the nucleic acids, the quantification was performed by spectrophotometry at 260 nm and the ratio of the absorbance at 260 and 280 nm (A260/280). The complementary DNA (cDNA) synthesis was performed on 500 ng RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. For real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis of mRNA expression, the comparative Ct method was used to calculate relative expression [26]. Taqman probes for the *Myc* gene (Hs00153408_m1) and *Thp* gene (Hs00427621_m1) were purchased from Applied Biosystems.

qRT-PCR for miRNA expression analysis was performed using *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied Biosystems) for *hsa_miR-17* (NR_002308), *hsa_miR-19a* (NR_000395), *hsa_miR-19b* (NR_000396), *hsa_miR-20a* (NR_000580), and *hsa_miR-92a* (NR_000430). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was employed to quantify the expression of miRNAs. miRNA levels were normalized to the expression level of the small nuclear RNA (snRNA) RNU6B (NR_002752) using a StepOne™ System (Applied Biosystems). Duplicate reactions were used in all PCR assays.

Immunohistochemical analysis

Bim protein expression was successfully analyzed in 33/41 samples by immunohistochemistry of TMA slides. Reactive lymph nodes were included in each TMA slide as immunoreactive controls. Antigen retrieval was performed in a steamer (Arno®) with Tris–EDTA buffer (pH 9.0) for 20 min at 98 °C. Sections were incubated with primary monoclonal anti-Bim antibody at a 1:200 dilution (AAP-330, Assay Resignin) overnight at 4 °C, and the detection was performed using the Dako EnVision system. Results were scored as negative if less than 10 % of the cells were positive and as positive if 10 % or more of the cells were positive. Images were acquired using a Nikon Eclipse E200 microscope connected to a Digital Sight scanning system and were captured using the NIS-Elements program V2.30 (Nikon, Japan).

Transfection of miR-17 hairpin inhibitor

The human BL-derived cell line Daudi (EBV+) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas,

VA, USA) and cultured and maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10 % FBS, 2 mmol/L L-glutamine, and penicillin/streptomycin at 37 °C and 5 % CO₂. The cells were placed in 12-well plates (2 × 10⁵ cells per well) in opti-MEM media (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and were transfected with either *miR-17* hairpin inhibitor (IH-300485-06, Dharmacon) or negative control based on *Caenorhabditis elegans* miRNA 67 (IN-001005-01, Dharmacon) using Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The cells were harvested at 24 or 48 h after transfection for protein analysis using Western blot as previously described [27] with the following antibodies: anti-Bim (C34C5, Cell Signaling), anti-c-Myc (9E10, Calbiochem), and anti-β-actin antibody (A3854 Sigma).

Statistical analysis

Comparisons between categorical data were performed with chi-square and Fisher's exact tests. Comparisons between medians were performed with Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests. All tests were two-sided, and results were considered statistically significant when $p < 0.05$. Overall survival (OS) was defined as the time period between diagnosis and disease-related death. OS was censored when the patient either was alive at the last follow-up or died from causes unrelated to the disease. OS probability rates were calculated using the Kaplan–Meier method and compared with the log-rank test univariate analysis and Cox proportional hazards regression for multivariate analysis [28]. All statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS for Windows, version 20.0, SPSS Inc.).

Results

Demographic, clinical, and biological characteristics

Baseline characteristics of the 41 pediatric BL patients enrolled in this study are summarized in Table 1. Patients included 31 males and 10 females (3:1). Mean and median ages of patients were 7.39 and 6, respectively (range, 2–18 years). EBV was detected in 52.6 % (20/38) of the cases. EBV status from two cases was unavailable. Only one patient had BL associated with human immunodeficiency virus (HIV). Regarding the disease stage, 33 out of 41 patients (80.5 %) were diagnosed with stage III or IV according to the St. Jude system at the time of diagnosis. All 41 cases of pBL were assessed for MYC translocation by FISH analysis. Of these, we detected six negative cases that

Table 1 Patients' baseline characteristics

Characteristic	Number (%)
Diagnostic	
BL	40 (97.6)
BL-HIV	1 (2.4)
Gender	
Female	10 (24.4)
Male	31 (75.6)
Age (years)	
Range	2–18
Mean	7.4
Median	6
Stage (St. Jude)	
I/II	8 (19.5)
III/IV	33 (80.5)
LDH	
>1000	20 (48.8)
≤1000	21 (51.2)
EBV	
Positive	20 (52.6)
Negative	18 (47.4)
MYC rearrangement	
Positive	35 (85.4)
Negative	6 (14.6)
Outcome	
Live	30 (73.2)
Dead	11 (26.8)

LDH lactate dehydrogenase (normal level ≤500 U/L), HIV human immunodeficiency virus, EBV Epstein–Barr virus

had the morphology, immunophenotype, and clinical presentation of typical BL. EBV analysis was positive in two cases, whereas four tumors were EBV-negative (Table 2). The absence of *c-Myc* translocations was confirmed by repeating the FISH analysis. Neither clinical characteristics nor EBV status was different between FISH-positive and FISH-negative cases (Table 3). The outcome data were analyzed in 40 patients with a median follow-up of 38.5 months (range, 1–69 months). The HIV–BL patient was excluded from the survival analysis.

Table 2 Patients' characteristics of MYC-negative cases

Patient	Age/gender	Initial site of disease	LDH (U/L)	Stage	EBER-ISH	Follow-up
1	11/M	Ileum	385	II	Negative	Alive
2	10/F	Nasopharyngeal mass	575	II	Negative	Alive
3	6/F	Abdomen	536	III	Negative	Alive
4	9/M	Cervical mass	315	I	Negative	Alive
5	4/M	Abdomen	570	III	Positive	Alive
6	6/F	Abdomen	1613	III	Positive	Alive

LDH lactate dehydrogenase, EBER-ISH EBV-encoded RNA-in situ hybridization, EBV Epstein–Barr virus

Table 3 Comparison between MYC translocation-positive and negative cases

Characteristic	Myc rearrangement		p value
	Positive	Negative	
Stage (St. Jude)			
I/II	5	3	0.077 ^a
III/IV	30	3	
LDH			
>1000	19	1	0.184 ^a
≤1000	16	5	
EBV			
Positive	18	2	0.395 ^a
Negative	14	4	
MYC mRNA level			
Range	0.22–28.66	0.66–4.39	
Mean	6.81	2.33	0.241 ^b
miR-17 level			
High	10	0	0.307 ^a
Low	24	6	
miR-19a level			
High	5	0	1.000 ^a
Low	27	4	
miR-19b level			
High	14	0	0.141 ^a
Low	18	4	
miR-20a level			
High	10	0	0.168 ^a
Low	22	6	
miR-92a level			
High	7	1	1.000 ^a
Low	26	5	

LDH lactate dehydrogenase (normal level ≤500 U/L), EBV Epstein–Barr virus

^a Chi-square test

^b Mann–Whitney test

miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a are differentially expressed in BL tumor samples

Expression levels of miR-17, miR-19a/b, miR-20a, and miR-92a were quantified by qRT-PCR in 40/41, 36/41,

38/41, and 39/41 BL tumor samples, respectively. First, we compared the relative miRNA expression levels among the five members of the cluster. The analysis revealed a statistically significant difference ($p=0.025$) using the Kruskal–Wallis test. After, we compared the level between two pairs of miRNAs using the Mann–Whitney test and a significant difference between miR-17 vs. miR-92a levels ($p=0.008$) and miR-19a vs. miR-92a levels ($p=0.004$) and a trending difference between miR-20a vs. miR-92a levels ($p=0.052$) were detected. These data suggest that miR-92a expression is the lowest among miR-17-92 members in pBL tumors. Additionally, *miR-19a* was the most expressed among the members of the cluster 17-92 in pBL samples (Fig. 1).

***Myc* mRNA expression in BL tumor samples does not correlate with 17-92 cluster members' expression**

Myc mRNA was quantified using qRT-PCR in only 32 out of 41 BL samples due to poor quality of mRNA from FFPE tissue samples. The *Myc* mRNA mean level was 6.11 (range, 0.22–28.66). Although it was observed that *Myc* mRNA expression levels in cases negative for *Myc* translocation were lower than those in positive samples (2.33 vs. 6.81), this difference was not statistically significant ($p=0.241$) possibly due to the small number of negative samples (Table 3). Additionally, we did not observe a correlation between miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a, and *Myc* mRNA levels ($p=0.443$, $p=0.787$, $p=0.976$, $p=0.768$, and $p=0.285$, respectively).

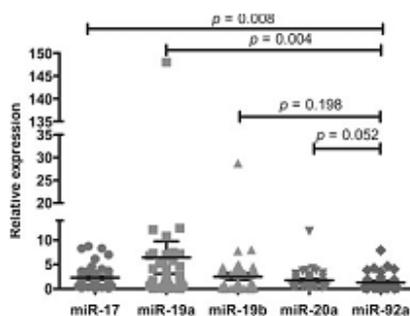


Fig. 1 Relative expression of miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a in pBL tumor samples. Expression of each miRNA was normalized to the expression level of RNU6B and further by the mean expression of eight reactive lymph node samples. miRNA expression levels were compared using the Kruskal–Wallis test ($p=0.0212$), then followed by the Mann–Whitney test for pairwise comparisons, using Bonferroni's correction for the p value. Differences in miRNA expression levels were considered statistically significant when $p<0.05$

Bim protein expression does not correlate with survival of pBL patients

Bim is an important pro-apoptotic member of the Bcl-2 family; thus, we hypothesized if Bim expression was associated with treatment response. Bim protein expression was analyzed in 33 out of 41 pBL tumors. Bim expression was observed in 22/33 tumor samples (66.7 %). Eleven tumor samples (33.3 %) did not show Bim expression. Representative results are depicted in Fig. 2. However, the Kaplan–Meier curve and log-rank test suggested that Bim expression has no prognostic impact in pBL ($p=0.374$, graphic not shown).

miR-17 and miR-20a high levels correlate with absent Bim protein expression in pBL cases

Because Bim is described as a post-transcriptional target of miR-17-92 cluster members, we investigated whether miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a expression levels correlated with Bim protein expression in pBL samples. Indeed, we observed that miR-17 and miR-20a expression were associated with absence of Bim protein expression ($p<0.000$ and $p<0.000$, respectively, Mann–Whitney test). However, no significant correlation was observed regarding miR-19a, miR-19b, miR-92a, and Bim expression ($p=0.13$, $p=0.28$, and $p=0.13$, respectively) (Fig. 3).

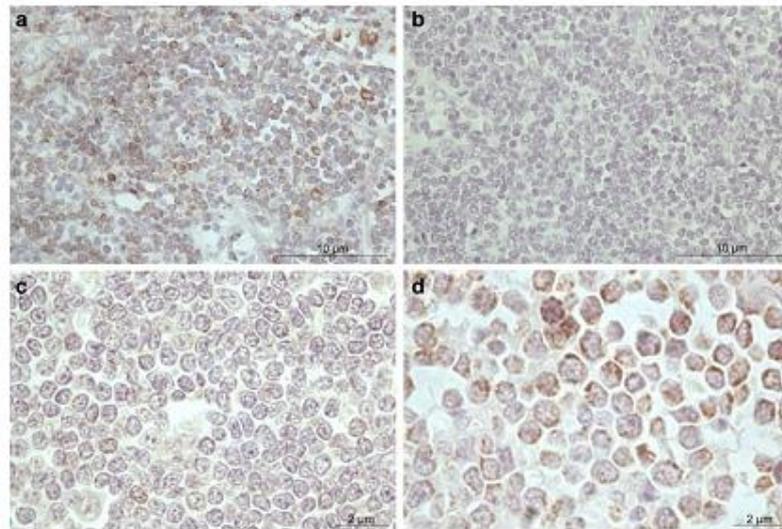
miR-17 inhibition releases Bim expression in BL cells

Since miR-17 had a strong prognostic impact and was associated with Bim expression, we inhibited miR-17 expression in order to explore the targets regulated by this member of the 17-92 cluster. Indeed, we observed an increase of Bim protein in Daudi cells transfected with a miR-17 hairpin inhibitor at 24 and 48 h post-transfection. Additionally, we were also able to detect an increase of c-MYC at 24 h which corroborates the feedback regulatory loop between c-Myc and the miR-17-92 cluster [29] (Fig. 4).

miR-17 high levels correlate with poor overall survival of pBL patients

Next, we questioned if miR-17-92 cluster members' expression was associated with pBL patient prognosis. Using the mean relative expression levels as threshold values, we analyzed whether there was a correlation between the OS of pBL patients and miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a expression. miRNA expression in pBL tumors above or below the mean threshold value was considered highly or lowly expressed, respectively. OS was analyzed in 39/41, 35/41, 35/41, 39/41, and 38/41 patients according to miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a expression levels, respectively. Notably, patients whose tumors had higher levels

Fig. 2 Representative immunohistochemical detection of Bim expression in pBL. **a** Reactive lymph node cells were used as positive controls; **b** negative control (primary antibody omitted); **c** negative expression (less than 10 % positive tumor cells); and **d** positive expression (over 10 % positive tumor cells)



of miR-17 displayed poorer 5-year OS compared to those whose tumors express lower levels ($p=0.007$) (Fig. 5a). Moreover, the multivariate Cox analysis showed that a high miR-17 was an independent factor for poor survival in pBL

(HR = 3.68, $p=0.034$) (Table 4). There was a trend for patients whose tumors had higher levels of miR-19a and miR-20a to have a poorer 5-year OS compared to those whose tumors express lower levels ($p=0.06$ and $p=0.078$, respectively)

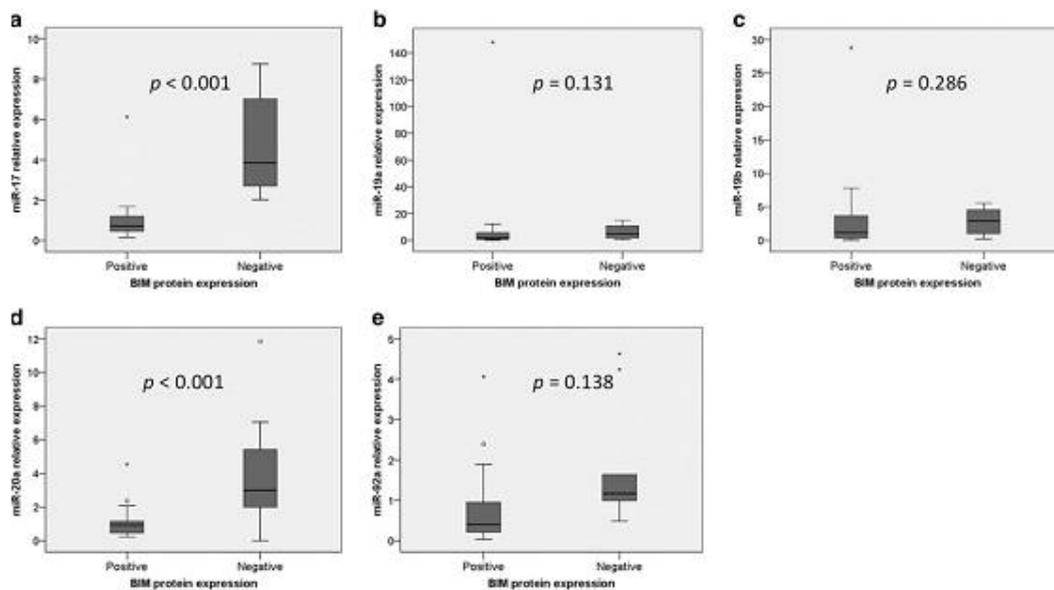


Fig. 3 Comparison between miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a levels and Bim protein expression in pBL. Expression levels of miR-17 (a), miR-19a (b), miR-19b (c), miR-20a (d), and miR-92a (e) were evaluated according to the presence or the lack of Bim protein expression

by the Mann–Whitney test. Differences in miRNA expression levels between Bim positive and negative cases were considered statistically significant when $p < 0.05$

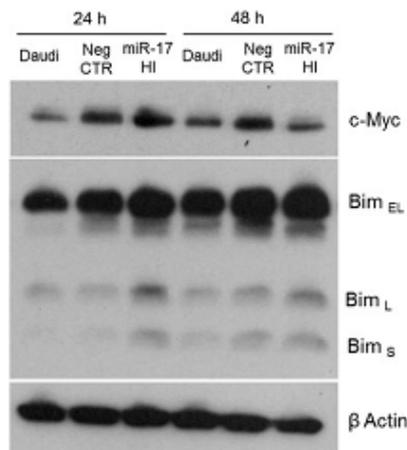


Fig. 4 miR-17 inhibition by a hairpin inhibitor in Daudi cells, a Burkitt lymphoma cell line that overexpresses the miR-17-92 cluster. Bim and c-MYC expression were analyzed in cells transfected with miR-17 hairpin inhibitor (*HI*) or negative control. The inhibition of miR-17 increased c-MYC expression at 24 h post-transfection (*upper line*). The inhibition of miR-17 increased the expression of all isoforms of Bim at 24 and 48 h post-transfection (*middle line*). β -Actin expression served as a protein loading control. One representative of two independent experiments is shown

(Fig. 5b, d). Conversely, the relative expression levels of miR-19b and miR-92a did not impact the 5-year OS ($p=0.20$ and $p=0.954$, respectively) (Fig. 5c, e).

Discussion

The miR-17-92 cluster is located in the third intron of the gene *C13orf25* (chromosome 13 open reading frame 25). All miRNAs are located in close proximity, spanning a total of 800 base pairs [30] on chromosome 13q31-q32, a region that is frequently amplified in BL, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, and diffuse large-cell lymphoma (DLCL) [31, 32]. miR-17-92 (named *OncomiR-1*) was the first MYC-regulated miRNA cluster identified whose overexpression occurs through MYC-mediated transcriptional upregulation and MYC amplification [29]. The expression of the miR-17-92 cluster is activated by c-MYC binding in the E-box located in the first intron region of the gene [3]. Additionally, the transcription factors E2F1, E2F2, and E2F3 are also able to directly bind and activate the promoter region of the miR-17-92 cluster [33]. However, E2F1, a direct target of c-MYC, is negatively regulated by two components of this miRNA cluster, miR-17 and miR-20a, implying the presence of an autoregulatory feedback loop [34].

Overexpression of the miR-17-92 cluster has been observed in B cell lymphomas and several other tumors,

emphasizing its tumorigenic potential. In fact, the oncogenic role of the miR-17-92 cluster was confirmed in the *Eu-myc* BL mouse model, where the co-expression of *miR-17-19b* and *c-Myc* accelerated lymphomagenesis as a result of apoptosis inhibition [35]. A recent study using RNA sequence analysis showed that miR-17-92 expression was 10-fold higher in BL than in DLBCL. More precisely, miR-17-92 upregulation was observed in all 28 BL cases analyzed [36]. Another group performed integrative analysis of miRNA-mRNA expression in fresh-frozen and FFPE BL samples, showing that at least 40–50 genes were targeted by members of the miR-17-92 cluster being MYC-regulated in BL. Upregulated miRNAs in the BL correlated with corresponding low expression of the target genes in BL [37].

Given the polycistronic structure of the miR-17-92 cluster, it is possible that the subsets of miR-17-92 components may be expressed at different levels in BL tumor samples. In the present study, we assessed whether there was a difference between the relative expression levels of the miRNAs that are coded in the same *C13orf25* gene and are controlled by the same promoter—miR-17, miR-19a, miR-19b1, miR-20a, and miR-92—in 41 pBL tumor samples. High levels of miR-19 compared with miR-92a have been observed in *c-Myc*-driven tumors and in BL cell lines when compared with normal B cells isolated from the peripheral blood [38]. Thus, we focused on miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a that were described to repress the expression of the pro-apoptotic protein Bim and other targets in BL [13].

Along with the potential differences in biogenesis, miRNAs encoded by a polycistron gene may have different turnover rates [13], which may result in different levels of each functional miRNA transcript as confirmed by our findings. Moreover, in our study, the comparison of the relative expression levels between miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a in pBL tumor revealed statistically significant lower miR-92a expression levels when compared with miR-17 and miR-19a expression levels ($p=0.008$ and $p=0.004$, respectively). The mechanism that leads to these differing expression levels among miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a identified by us is unknown and may be related to specificities in half-life and degradation of individual miRNAs. Moreover, the role of each miRNA in BL is also unclear [39]. It is likely that the biological context can select specific components of the miR-17-92 cluster during BL lymphomagenesis. Conversely, upregulation of miR-92a compared with the other miR-17-92 has been reported in several solid tumors such as colon cancers [40]. Our data suggest that lower miR-92a expression in comparison with the other miR-17-92 components may be a feature that is specific to BL.

Comparing miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a expression with centroblast cells, Iqbal and co-workers observed higher expression of all 17-92 cluster members in BL cases and cell lines. In their study, they included both adult

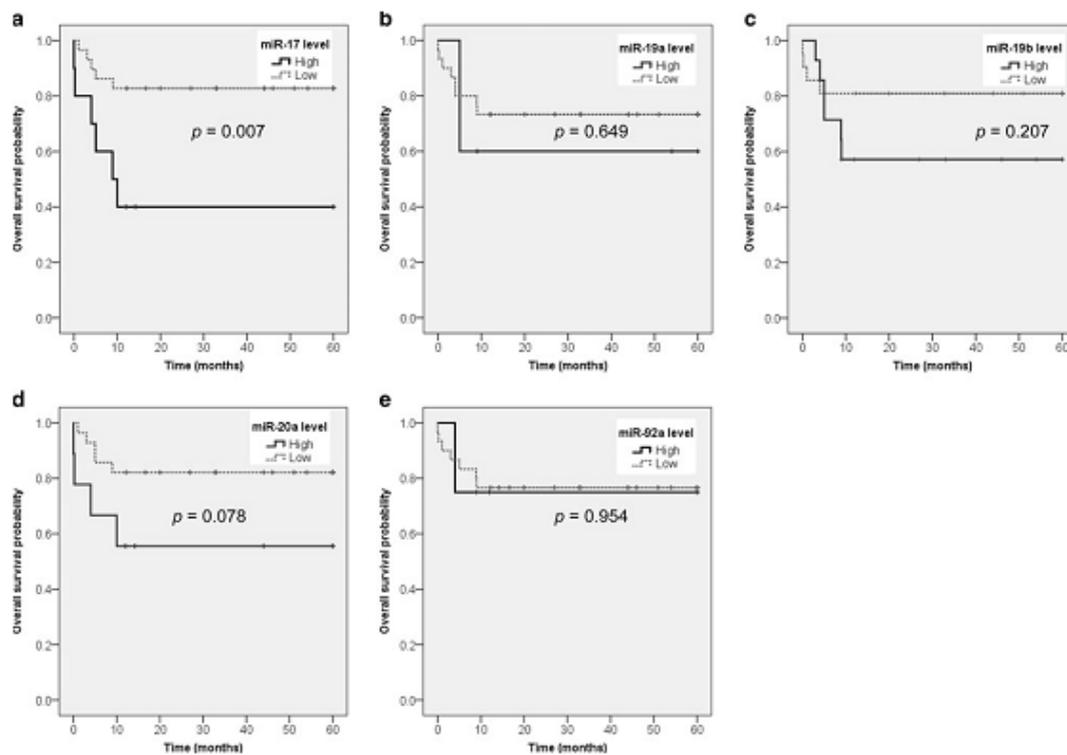


Fig. 5 Kaplan–Meier curves displaying pBL OS according miR-17 (a), miR-19a (b), miR-19b (c), miR-20a (d), and miR-92a (e) expression. Mean relative expression of each miRNA was used as threshold: pBL tumors with above mean expression of a given miRNA were considered

to exhibit high expression of this miRNA, and pBL tumors with below mean expression of a given miRNA were considered to exhibit low expression of this miRNA. Differences in OS according to miRNA expression levels were considered statistically significant when $p < 0.05$

and pediatric BL cases and performed a microarray analysis; thus, they were not able to compare the expression between each cluster member [37]. Our results demonstrate that miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a expression is higher in pBL than in reactive lymph nodes. Each miRNA expression in pBL was normalized by its expression in reactive lymph nodes (Fig. 1). Following this analysis, we

observed at least 1.5-fold increase (miR-92a) in each miRNA expression in pBL in comparison with reactive lymph nodes. This increase ranged from 1.5- up to 6-fold in the case of miR-19a. Thus, even though we only had access to full lymph node cell content, we were able to compare for the first time to our knowledge the expression between each cluster member exclusively in pBL cases.

We also observed that pBL cases with high levels of miR-17 and miR-20a ($p < 0.000$, $p < 0.000$, respectively) but not miR-19a, miR-19b, and miR-92a were associated with the absence of Bim protein expression ($p = 0.13$, $p = 0.28$, $p = 0.138$, respectively). *Bim* is a potent tumor suppressor gene involved in B cell transformation, and even a single allele inactivation of *Bim* accelerates Myc-induced tumor development in *Eμ-Myc* mice [41]. Silencing of the *Bim* gene by promoter methylation and bi-allelic deletion has been reported in lymphomas [42]. Indeed, we detected methylation in the *Bim* promoter using pyrosequencing assay in 11 out of 21 pBL samples but an association was not observed between methylation and lack of Bim protein expression ($p = 0.635$) (data

Table 4 Prognostic value of miR-17 in pBL using the multivariate Cox regression model

Variable	Overall survival			
	Hazard ratio	95 % CI		p value
		Lower	Upper	
miR-17 (high vs. low)	8.945	2.150	37.212	0.003
LDH level	1.001	1.000	1.001	0.045
EBV (positive vs. negative)	0.334	0.075	1.489	0.150

not shown). Moreover, Bim post-transcriptional regulation by miRNAs was observed in a BL cell line [43]. In the present series, a lack of Bim protein expression was detected in 11 out of 33 BL cases (33.3 %). Our results highlight the relevant role of Bim protein inactivation on BL pathogenesis as a way to shift the balance away from apoptosis and towards proliferation in MYC-driven tumors [44]. As our results indicate, the cases that lacked Bim expression were more likely to express high levels of miR-17 and miR-20a, suggesting that Bim inactivation may also occur via miR-17 and miR-20a post-transcriptional regulation. Alternatively, deletion or methylation of the *Bim* gene may lead to Bim inactivation. Deletions of the *Bim* locus were detected in up to 40 % of mantle cell lymphomas [45], and methylation of the *Bim* gene was observed in 5 of 10 (50 %) BL patients' biopsies [42].

In our study, we did not find a correlation between the absence of Bim expression in BL tumors and the presence of the Epstein-Barr virus (EBV) (data not shown). However, Anderton and colleagues showed that EBV regulates Bim expression at the transcriptional level through the action of its proteins EBNA3A and EBNA3C [46]. This does not exclude other alternative mechanisms leading to *Bim* inactivation (for example, miRNA), which may increase the likelihood of B cell transformation. Moreover, BL cells were found to differ on EBV dependence to prevent apoptosis according to the EBV latency pattern [47].

It has been proposed that miR-17 may be redundant during MYC-induced lymphomagenesis given that c-MYC promotes cell proliferation and transcriptionally represses targets related to inhibition of proliferation such as p21 (CDKN1A) [13]. Previously, it has been observed that the transfection of anti-sense oligonucleotides against miR-17 and miR-20a upregulates of CDKN1A/p21 decreased cell growth and induced G1/S phase cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cell line Jeko-1 [43]. In a study of 30 pediatric BL tumors, Miles and colleagues showed a lack of detectable p21 expression in all BL cases, which was associated with deregulation of the *TP53* pathway [48]. We observed that BL patients exhibiting relatively higher expression levels of miR-17 had a shorter OS ($p = 0.034$, multivariate Cox's regression analysis). It is conceivable that the proliferative effects of miR-17 that occur via inhibition of p21 could synergize with other alterations in these BL patients and contribute to adverse outcomes observed in the present study. Moreover, fine-tuning gene expression by miR-17 depends on differing degrees of complementarity to its target sequences in comparison with other miRNAs in the miR-17-92 cluster, including its homologue miR-20a. In other words, miR-17 target specificity may impact treatment response and outcome.

In our series, a small number of BL cases (6 out of 41) had undetectable MYC translocation when analyzed by FISH suggesting that alternative mechanisms led to lymphoma pathogenesis as previously described by others [49, 50]. Because

the miR-17-92 cluster is a MYC target [3], we analyzed the relative levels of miR-17-92 members in our tumor samples that were negative and positive for MYC translocation. We did not observe a difference in miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, or miR-92a expression in pBL tumors with different MYC rearrangement statuses indicating that miR-17-92 may be expressed by other mechanisms in *Myc* classical translocation-negative pBL tumors, t(8;14, 2;8, and 8;22).

In summary, we are the first to describe miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-20a, and miR-92a expression profiles in pBL. Remarkably, a lower expression of miR-92a was observed in pBL tumor samples. Additionally, higher levels of miR-17 and miR-20a correlated with a lack of Bim protein expression. miR-17 role in preventing Bim and c-MYC expression was further confirmed when inhibition of miR-17 released their protein expression. Moreover, higher levels of miR-17 had a negative prognostic impact in multivariate Cox analysis which revealed miR-17 as a prognostic factor independent of other prognostic variables for pBL. Importantly, this finding should be validated in larger series as a potential molecular marker to discriminate pBL prognostic subgroups, providing a new therapeutic avenue in the era of anti-miRNA therapy research. Further investigations of the functional role of specific miR-17-92 cluster members in BL are also required.

Acknowledgments We are grateful to all the clinicians who followed the patients included in the study. This work was supported by grants from Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) para Controle do Câncer: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 573806/2008-0/FAPERJ E26/170.026/2008, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) E-26/110.238/2014—PPSUS, Programa de Oncobiologia/Fundação do Câncer, and FAPERJ E-26/110.375/2014. SWISS-BRIDGE Foundation, sub-project 1B/2014. MCR and RSF had a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PDSE) and Ministério da Saúde/INCA, respectively.

Compliance with ethical standards The study was approved by the institutional ethics committee (registration number 18/09), in accordance with the Declaration of Helsinki.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Dang CV (2012) MYC on the path to cancer. *Cell* 149(1):22–35. doi:10.1016/j.cell.2012.03.003
2. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006) The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 16(4): 253–264. doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.014
3. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435(7043):839–843. doi:10.1038/nature03677

4. Baudino TA, Maclean KH, Brennan J, Parganas E, Yang C, Aslanian A et al (2003) Myc-mediated proliferation and lymphomagenesis, but not apoptosis, are compromised by E2f1 loss. *Mol Cell* 11(4):905–914
5. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM et al (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 40(1):43–50. doi:10.1038/ng.2007.30
6. Bueno MJ, Gomez de Cedron M, Gomez-Lopez G, Perez de Castro I, Di Lísio L, Montes-Moreno S et al (2011) Combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway. *Blood* 117(23):6255–6266. doi:10.1182/blood-2010-10-315432
7. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
8. Fernando TR, Rodriguez-Malave NI, Rao DS (2012) MicroRNAs in B cell development and malignancy. *J Hematol Oncol* 5:7. doi:10.1186/1756-8722-5-7
9. Lawrie CH (2008) MicroRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy? *J Cell Mol Med* 12(5A):1432–1444. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00399.x
10. Musilova K, Mráz M (2015) MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia* 29(5):1004–1017. doi:10.1038/leu.2014.351
11. Altvia Y, Landgraf N, Lithwick G, Elefant N, Pfeiffer S, Aravin A et al (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 33(8):2697–2706. doi:10.1093/nar/gki567
12. Tanzer A, Stadler PF (2004) Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 339(2):327–335. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.065
13. Olive V, Li Q, He L (2013) miR-17-92: a polycistronic oncomir with pleiotropic functions. *Immunol Rev* 253(1):158–166. doi:10.1111/immr.12054
14. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043):834–838. doi:10.1038/nature03702
15. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J et al (2008) Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9(4):405–414. doi:10.1038/ni1575
16. Jin HY, Oda H, Lai M, Skalsky RL, Bethel K, Shepherd J et al (2013) MicroRNA-17-92 plays a causative role in lymphomagenesis by coordinating multiple oncogenic pathways. *EMBO J* 32(17):2377–2391. doi:10.1038/emboj.2013.178
17. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ et al (2008) Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132(5):875–886. doi:10.1016/j.cell.2008.02.019
18. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982) Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(24):7824–7827
19. Robertus JL, Klüiver J, Weggemans C, Harms G, Reijmers RM, Swart Y et al (2010) MiRNA profiling in B non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma. *Br J Haematol* 149(6):896–899. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08111.x
20. Li Y, Choi PS, Casey SC, Dill DL, Felsher DW (2014) MYC through miR-17-92 suppresses specific target genes to maintain survival, autonomous proliferation, and a neoplastic state. *Cancer Cell* 26(2):262–272. doi:10.1016/j.ccr.2014.06.014
21. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117(19):5019–5032. doi:10.1182/blood-2011-01-293050
22. Murphy SB (1980) Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Semin Oncol* 7(3):332–339
23. Klumb CE, Schramm MT, De Resende LM, Carrico MK, Coelho AM, de Meis E et al (2004) Treatment of children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in developing countries: the experience of a single center in Brazil. *J Pediatr Hematol Oncol* 26(7):462–468
24. Klumb CE, Hassan R, De Oliveira DE, De Resende LM, Carrico MK, De Almeida DJ et al (2004) Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int J Cancer: Journal international du cancer* 108(1):66–70. doi:10.1002/ijc.11443
25. Queiroga EM, Gualco G, Weiss LM, Dittmer DP, Araujo I, Klumb CE et al (2008) Burkitt lymphoma in Brazil is characterized by geographically distinct clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol* 130(6):946–956. doi:10.1309/AJCP64YOHAWLUMPK
26. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta C(T)) method. *Methods* 25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
27. Psathas JN, Doonan PJ, Raman P, Freedman BD, Minn AJ, Thomas-Tikhonenko A (2013) The Myc-miR-17-92 axis amplifies B-cell receptor signaling via inhibition of ITIM proteins: a novel lymphomagenic feed-forward loop. *Blood* 122(26):4220–4229. doi:10.1182/blood-2012-12-473090
28. Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric-estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53(282):457–481. doi:10.2307/2281868
29. Majello B, Perini G (2015) Myc proteins in cell biology and pathology. *Biochim Biophys Acta* 1849(5):467–468. doi:10.1016/j.bbagr.2014.12.006
30. Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW et al (2006) Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 349(1):59–68. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.207
31. Ota A, Tagawa H, Kaman S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S et al (2004) Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64(9):3087–3095
32. Tagawa H, Seto M (2005) A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 19(11):2013–2016. doi:10.1038/sj.leu.2403942
33. Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F et al (2007) An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem* 282(4):2135–2143. doi:10.1074/jbc.M608939200
34. Olive V, Jiang I, He L (2010) miR-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol* 42(8):1348–1354. doi:10.1016/j.biocel.2010.03.004
35. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernandez-Monge E, Mu D, Goodson S et al (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435(7043):828–833. doi:10.1038/nature03552
36. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M et al (2012) Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490(7418):116–120. doi:10.1038/nature11378
37. Iqbal J, Shen Y, Huang X, Liu Y, Wake L, Liu C et al (2015) Global microRNA expression profiling uncovers molecular markers for classification and prognosis in aggressive B-cell lymphoma. *Blood* 125(7):1137–1145. doi:10.1182/blood-2014-04-566778
38. Olive V, Sabio E, Bennett MJ, De Jong CS, Biton A, McGann JC et al (2013) A component of the miR-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis. *eLife* 2, e00822. doi:10.7554/eLife.00822

39. Lai M, Xiao C (2015) Functional interactions among members of the miR-17-92 cluster in lymphocyte development, differentiation and malignant transformation. *Int. Immunol.* doi:10.1016/j.intimp.2015.03.041.
40. Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T et al (2011) miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci* 102(12):2264–2271. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02081.x
41. Egle A, Harris AW, Bouillet P, Cory S (2004) Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16):6164–6169. doi:10.1073/pnas.0401471101
42. Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA, Siebert R, Climent J, Fresquet V et al (2007) Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 109(1):271–280. doi:10.1182/blood-2006-06-026500
43. Inomata M, Tagawa H, Guo YM, Kameoka Y, Takahashi N, Sawada K (2009) MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 113(2):396–402. doi:10.1182/blood-2008-07-163907
44. Psathas JN, Thomas-Tikhonenko A (2014) MYC and the art of microRNA maintenance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 4(8). doi:10.1101/cshperspect.a014175.
45. Tagawa H, Karman S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A et al (2005) Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24(8):1348–1358. doi:10.1038/sj.onc.1208300
46. Anderton E, Yee J, Smith P, Crook T, White RE, Allday MJ (2008) Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 27(4):421–433. doi:10.1038/sj.onc.1210668
47. Vereide DT, Sugden B (2011) Lymphomas differ in their dependence on Epstein-Barr virus. *Blood* 117(6):1977–1985. doi:10.1182/blood-2010-05-285791
48. Leventaki V, Rodic V, Tripp SR, Bayerl MG, Perkins SL, Barnette P et al (2012) TP53 pathway analysis in paediatric Burkitt lymphoma reveals increased MDM4 expression as the only TP53 pathway abnormality detected in a subset of cases. *Br J Haematol* 158(6):763–771. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09243.x
49. Pienkowska-Grela B, Rymkiewicz G, Grygalewicz B, Woroniecka R, Krawczyk P, Czyz-Domanska K et al (2011) Partial trisomy 11, dup(11)(q23q13), as a defect characterizing lymphomas with Burkitt pathomorphology without MYC gene rearrangement. *Med Oncol* 28(4):1589–1595. doi:10.1007/s12032-010-9614-0
50. Salaverria I, Martin-Guerrero I, Wagener R, Kreuz M, Kohler CW, Richter J et al (2014) A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of MYC-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. *Blood* 123(8):1187–1198. doi:10.1182/blood-2013-06-507996

10.2 Trabalho científico publicado tendo sido desenvolvido em paralelo ao projeto de tese de doutorado

ROBAINA MC, MAZZOCOLI L, ARRUDA VO, REIS FR, APA AG, DE REZENDE LM, KLUMB CE. **Deregulation of DNMT1, DNMT3B and miR-29s in Burkitt lymphoma suggests novel contribution for disease pathogenesis.** *Exp Mol Pathol.* 2015 Apr;98(2):200-7.

Experimental and Molecular Pathology 98 (2015) 200–207



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexmp



Deregulation of DNMT1, DNMT3B and miR-29s in Burkitt lymphoma suggests novel contribution for disease pathogenesis



Marcela C. Robaina ^{a,1}, Luciano Mazzoccoli ^{a,1}, Viviane Oliveira Arruda ^{a,1}, Flaviana Ruade de Souza Reis ^a, Alexandre Gustavo Apa ^b, Lidia Maria Magalhães de Rezende ^c, Claudete Esteves Klumb ^{a,*}

^a Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^b Serviço de Hematologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^c Divisão de Patologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 October 2014
and in revised form 23 January 2015
Accepted 2 March 2015
Available online 4 March 2015

Keywords:
Burkitt lymphoma
DNMT1
DNMT3A
DNMT3B
miR-29 family
Decitabine

ABSTRACT

Methylation of CpG islands in promoter gene regions is frequently observed in lymphomas. DNA methylation is established by DNA methyltransferases (DNMTs). DNMT1 maintains methylation patterns, while DNMT3A and DNMT3B are critical for de novo DNA methylation. Little is known about the expression of DNMTs in lymphomas. DNMT3A and 3B genes can be regulated post-transcriptionally by miR-29 family. Here, we demonstrated for the first time the overexpression of DNMT1 and DNMT3B in Burkitt lymphoma (BL) tumor samples (69% and 86%, respectively). Specifically, the treatment of two BL cell lines with the DNMT inhibitor 5-aza-dC decreased DNMT1 and DNMT3B protein levels and inhibited cell growth. Additionally, miR-29a, miR-29b and miR-29c levels were significantly decreased in the BL tumor samples. Besides, the ectopic expression of miR-29a, miR-29b and miR-29c reduced the DNMT3B expression and miR-29a and miR-29b lead to increase of $p16^{INK4a}$ mRNA expression. Altogether, our data suggest that deregulation of DNMT1, DNMT3B and miR29 may be involved in BL pathogenesis.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

10.3 Trabalho científico publicado não relacionado à tese de doutorado e desenvolvido durante o mestrado

ROBAINA MC, FACCION RS, ARRUDA VO, DE REZENDE LM, VASCONCELOS GM, APA AG, BACCHI CE, KLUMB CE. **Quantitative analysis of CDKN2A methylation, mRNA, and p16^{INK4a} protein expression in children and adolescents with Burkitt lymphoma: biological and clinical implications.** *Leuk Res.* Feb;39(2):248-56. 2015.

Leukemia Research 39 (2015) 248–256



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres



Quantitative analysis of *CDKN2A* methylation, mRNA, and p16^{INK4a} protein expression in children and adolescents with Burkitt lymphoma: Biological and clinical implications



Marcela Cristina S. Robaina^a, Roberta Soares Faccion^a, Viviane Oliveira Arruda^a, Lidia Maria Magalhães de Rezende^b, Gisele Moledo Vasconcelos^c, Alexandre Gustavo Apa^d, Carlos E. Bacchi^e, Claudete Esteves Klumb^{a,*}

^a Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^b Divisão de Patologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^c Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrica, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^d Serviço de Hematologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^e Consultoria em Patologia, Botucatu, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2014

Received in revised form

24 November 2014

Accepted 25 November 2014

Available online 9 December 2014

Keywords:

Burkitt lymphoma

CDKN2A

Methylation

p16^{INK4a}

Pyrosequencing

Survival

ABSTRACT

CDKN2A is a tumor suppressor gene critical in the cell cycle regulation. Little is known regarding the role of *CDKN2A* methylation in the pathogenesis of Burkitt lymphoma (BL). *CDKN2A* methylation was investigated using pyrosequencing in 51 tumor samples. p16^{INK4a} mRNA and protein levels were measured using real-time PCR and immunohistochemistry, respectively. *CDKN2A* methylation was detectable in 72% cases. Nuclear expression of p16^{INK4a} was not detected in 41% cases. There was an association between methylation and absence of *CDKN2A* mRNA ($P=0.003$). In conclusion, *CDKN2A* methylation occurs at a high frequency suggesting a role in BL pathogenesis and potential therapeutic implications.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

10.4 Trabalhos científicos publicados em colaboração, não relacionados à tese de doutorado cuja colaboração ocorreu durante o doutorado

10.4.1 MAIA RC, BONAMINO MH, ROBAINA MC, AMARAL N, BONECKER S, ZALCBERG IR, KLUMB CE. **An unusual long-term outcome of a child with primary myelofibrosis harboring a JAK2 mutation.** *Blood Cells Mol Dis.* 2015 Dec;55(4):347-50.

10.4.2 NESTAL DE MORAES G, DELBUE D, SILVA KL, **ROBAINA MC**, KHONGKOW P, GOMES AR, ZONA S, CROCAMO S, MENCALHA AL, MAGALHÃES LM, LAM EW, MAIA RC. **FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance.** *Cell Signal.* 2015 Dec;27(12):2496-505.

10.4.3 LUCENA PI, FAGET DV, PACHULEC E, **ROBAINA MC**, KLUMB CE, ROBBS BK, VIOLA JP. **NFAT2 Isoforms Differentially Regulate Gene Expression, Cell Death, and Transformation through Alternative N-Terminal Domains.** *Mol Cell Biol.* 2015 Oct 19;36(1):119-31.

10.4.4 MAIA RC, DE REZENDE LM, **ROBAINA M**, APA A, KLUMB CE. **Langerhans cell histiocytosis: differences and similarities in long-term outcome of paediatric and adult patients at a single institutional centre.** *Hematology.* 2015 Mar;20(2):83-92.

10.4.5 FERREIRA AC, **ROBAINA MC**, REZENDE LM, SEVERINO P, KLUMB CE. **Histone deacetylase inhibitor prevents cell growth in Burkitt's lymphoma by regulating PI3K/Akt pathways and leads to upregulation of miR-143, miR-145, and miR-101.** *Ann Hematol.* 2014 Jun;93(6):983-93.