

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

GUILHERMY VICTOR SOUSA DE ARAÚJO

**SIGNIFICADO CLÍNICO DO NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE DNA
MITOCONDRIAL (mtDNA) EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM
MIELOIDE**

**Recife
2018**

GUILHERMY VICTOR SOUSA DE ARAÚJO

**SIGNIFICADO CLÍNICO DO NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE DNA
MITOCONDRIAL (mtDNA) EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM
MIELOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Marco André Cavalcanti Bezerra

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Araújo, Guilhermy Victor Sousa de
Significado clínico do número relativo de cópias de DNA
mitocondrial (mtDNA) em neoplasias hematológicas de origem mieloide
/ Guilhermy Victor Sousa de Araújo - 2018.
94 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antônio Roberto Lucena de Araujo
Coorientador: Marco André Cavalcanti Bezerra
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. mtDNA 2. Prognóstico 3. Neoplasias mieloides I. Araújo, Antônio
Roberto Lucena de (orient.) II. Bezerra, Marco André Cavalcanti
(coorient.) III. Título

616.99419

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-443

GUILHERMY VICTOR SOUSA DE ARAÚJO

**SIGNIFICADO CLÍNICO DO NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE DNA
MITOCONDRIAL (mtDNA) EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM
MIELOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em 30/08/2018

Banca Examinadora:

Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Departamento de Genética

Dr. Will de Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Departamento de Antibióticos

Dr. Milena de Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) - FIOCRUZ
Departamento de Microbiologia

Dedico este trabalho a Sueli e Fernanda, por
todo amor e suporte diários.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer ao meu orientador Antonio Roberto, por todo conhecimento transmitido e suporte para conclusão desta dissertação. Obrigado por ser mais que um orientador na minha formação profissional, que em muitos momentos foi um conselheiro, confidente, pai e amigo.

Ao meu co-orientador, Marcos André, a oportunidade e confiança de entrar para o Núcleo Hematologia Clínica e Laboratorial – NHCL, mesmo me conhecendo tão pouco durante as aulas de Hematologia, acreditou no meu potencial. Agradeço toda a sua disponibilidade irrestrita, a sua forma exigente e crítica na execução deste trabalho, que contribuíram para minha capacitação profissional e pessoal.

À minha família, por todo amor, carinho e suporte incondicional a mim desprendido. Especialmente a minha namorada, Fernanda, por toda compreensão nos momentos de ausência durante essa jornada. Vou sempre ser grato e farei de tudo por vocês.

Aos amigos e colegas que fazem ou fizeram parte do NHCL, sintam-se agradecidos da forma mais especial e sincera, pois seria muito injusto citar nomes, visto que infelizmente iria acabar esquecendo algum dentre a tantos. Obrigado pelo acolhimento e bons momentos vividos mesmo em meio a tantas dificuldades. Em especial, gostaria de agradecer, a Juan, Diego e Peu, que desde a Iniciação científica sempre estiveram presentes contribuindo muito além do bom convívio e boas risadas, mas que são grandes tutores técnico-científicos na minha jornada acadêmica.

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao programa de pós-graduação em genética, pelo conhecimento e espaço cedido para o

desenvolvimento da pesquisa. A Fundação HEMOPE, em especial ao corpo clínico e aos pacientes, pelas amostras fornecidas, bem como toda a sua infraestrutura.

A CAPES e ao CNPq, pelo auxílio financeiro para realização do projeto e bolsa concedido durante o mestrado

De antemão, meus agradecimentos aos membros que compuseram a banca de defesa, pelas sugestões e análises significativas às quais tentarei atender na versão definitiva do manuscrito.

Por fim, de tal maneira importante, agradeço a Deus por todas realizações diárias conquistadas, que sempre está ao meu lado como guia e minha fortaleza nas horas mais difíceis.

O verdadeiro campeão sabe que a vida é feita de vitórias e derrotas. Com as vitórias ele percebe o que fez de certo. Com as derrotas, aprende e evolui.
(Shinyashiki; Roberto, 2007, p.169).

RESUMO

Variações no conteúdo de DNA mitocondrial (mtDNA) vêm sendo amplamente associados com um pior prognóstico e progressão da doença em vários tipos de tumores humanos. Contudo, o seu significado clínico nas neoplasias mieloides ainda é pouco explorado. O objetivo do trabalho foi realizar a quantificação relativa do mtDNA em pacientes com neoplasias mieloides e associar esses achados com evolução e desfecho clínico dos pacientes. Por meio da técnica de qPCR, determinamos o número relativo de cópias de mtDNA em 647 pacientes adultos diagnosticados com neoplasias mieloides entre abril de 2003 a maio de 2018 na Fundação HEMOPE. A título de comparação, foram incluídos 293 amostras de sangue periférico de voluntários saudáveis. O conteúdo de mtDNA foi significativamente maior em pacientes com leucemia aguda ($P < 0,05$). Além disso, o conteúdo de mtDNA foi associado com sobrevida livre de doença em pacientes com leucemia mielóide aguda (267 pacientes; $P = 0,019$) e leucemia promielocítica aguda (147 pacientes; $P = 0,024$). Em contraste, o mtDNA foi menor em pacientes com neoplasias mieloproliferativas (233 pacientes, $P < 0,05$). O conteúdo de mtDNA foi associado a níveis mais baixos de hemoglobina/hematócrito. Quando analisado individualmente, o mtDNA foi associado ao sexo em pacientes com trombocitemia essencial e a idade em pacientes com mielofibrose. Juntos, esses achados demonstram um papel importante do conteúdo de mtDNA mitocondrial em neoplasias hematológicas, mas não completamente compreendido.

Palavras-chave: mtDNA. Prognóstico. neoplasias mieloides.

ABSTRACT

Altered mitochondrial DNA (mtDNA) content have been widely associated with poor prognosis and disease progression in several types of human tumors, although its clinical significance in myeloid neoplasm has been much less explored. Here, we performed a relative quantification of mtDNA in patients with myeloid neoplasms and analyzed its relationship to hematologic recovery, relapse, and survival. Between April 2003 and May 2018, 647 patients with myeloid neoplasms diagnosed at a single reference center in northeast Brazil were included. For comparison purposes, the analysis included peripheral blood samples from 293 healthy volunteers. Using real-time quantitative polymerase chain reaction, we demonstrated that mtDNA content was significantly higher-than-normal in patients with acute leukemia ($P<0.05$). By contrast, mtDNA was lower-than-normal in patients with myeloproliferative neoplasms ($P<0.05$). mtDNA content was associated with lower disease-free survival in both acute myeloid leukemia (267 patients, $P=0.019$) and acute promyelocytic leukemia (147 patients, $P=0.024$). By contrast, mtDNA was lower in patients with myeloproliferative neoplasms (233 patients, $P<0.05$). mtDNA content was associated with lower hemoglobin/hematocrit levels. When analyzed individually, mtDNA was associated with sex in patients with essential thrombocythemia and age in patients with myelofibrosis. Together, these findings demonstrate an important, but not completely understood role for mitochondrial content in hematological neoplasms.

Keywords: mtDNA. Prognosis. myeloid neoplasms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Algoritmo de investigação clínica de pacientes com neoplasias mieloproliferativas Ph-negativas preconizado pela Organização Mundial de Saúde.....	31
Figura 2-	Contextualização entre principais manifestações laboratoriais e distribuição da frequência molecular nas NMPs Ph-negativas.....	36
Figura 3 -	Patogênese relacionada à JAK2V617F.....	38
Figura 4 -	Representação do DNA mitocondrial humano.....	42
Figura 5 -	Modelos de replicação do DNA mitocondrial humano.....	43
Figura 6 -	Diagrama esquemático de uma forquilha de replicação do DNA mitocondrial mostrando as proteínas essenciais para replicação.....	45
Figura 7 -	Variação do número de cópias de mtDNA ao longo do desenvolvimento embrionário.....	46
Figura 8 -	Hipótese do aumento do conteúdo mtDNA por aumento de ROS.....	49
Figura 9 -	Distribuição do número relativo de cópias de mtDNA em pacientes com LMA de novo e indivíduos saudáveis.....	58
Figura 10 -	Evolução clínica nos pacientes com Leucemia mieloide aguda de novo.....	61
Figura 11 -	Evolução clínica nos pacientes com LPA de acordo com o número relativo de cópias de mtDNA.....	66
Figura 12 -	Distribuição do número relativo de cópias de mtDNA em pacientes com neoplasia mieloproliferativas crônicas Ph-	

negativas e indivíduos saudáveis..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos Subtipos de Leucemia mieloide aguda de acordo com os critérios estabelecidos pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB).....	24
Tabela 2 -	Classificação dos subtipos de Leucemia mieloide aguda de acordo com a Organização Mundial de Saúde.....	25
Tabela 3 -	Estratificação prognóstica segundo alterações genéticas em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda.....	27
Tabela 4 -	Classificação das Neoplasias mieloproliferativas de acordo com a OMS.....	29
Tabela 5 -	Critérios diagnóstico para Policitemia vera preconizados pela OMS.....	32
Tabela 6 -	Critérios diagnóstico para Trombocitemia essencial preconizados pela OMS.....	34
Tabela 7 -	Critérios diagnósticos para Mielofibrose primária preconizados OMS.....	35
Tabela 8 -	Variação do número de cópias de DNA mitocondrial em diversos tipos de tumores.	47
Tabela 9 -	Sequência dos primers e tamanho esperado dos respectivos <i>amplicons</i>	53
Tabela 10 -	Configuração das condições de reação para determinação do número relativo de cópias de mtDNA.....	54
Tabela 11 -	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMA de acordo com o número relativo de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA).....	56

Tabela 12 -	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LPA de acordo com o número relativo de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA).....	64
Tabela 13 -	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMPs Ph-negativos de acordo com o número relativo de cópias de mtDNA.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
%	Percentual
µL	Microlitro
A	Adenina
ATP	Adenosina trifosfato
BCR	Breakpoint Cluster Region
BCR/ABL1	Gene de fusão resultante do cromossomo Filadélfia
BMO	Biópsia de Medula Óssea
C	Citosina
CALR	Calreticulina
CBF	Core binding factor
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CT	Cycle treshold
dL	Decilitro
D-LOOP	Laço de deslocamento
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etileno-diamino tetracético
EPO	Eritropoietina
ER	Receptor de Estrógeno
FAB	Franco-americano-britânico
G	Guanina
g	Gramma
g/dL	Gramma por decilitro
G-CSF	Fator Estimulante de Colônias Granulocíticas
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
Hb	Hemoglobina
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
Ht	Hematócrito
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IR (1-3)	Do inglês, Inibitory region
JAK2	Gene da Janus Quinase 2
JH(1-7)	Do inglês, Jak Homology domain
Kb	Quilo base
KCl	Cloreto de Potássio
LABCEN	Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas
LDH	Lactato desidrogenase
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
ME	Membrana externa
MFP	Mielofibrose primária

MI	Membrana interna
MO	Medula óssea
MPL	gene Myeloproliferative Leukemia Virus
mtDNA	Dna mitocondrial
mtRNAPOL	Rna polimerase mitocondrial
mtSSB	Proteínas de ligação a fita simples de mtdna
NaCl	Cloreto de Sódio
nDNA	Dna nuclear
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
NHCL	Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial
NMP	Neoplasia mieloproliferativa
NPM1	Nucleofosmina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio
OXPHOS	Sistema de fosforilação oxidativa
Pb	Pares de base
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Do inglês, Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism
Ph	Cromossomo Philadelphia
PK1	Gene Piruvato quinase 1
POLG	Polimerase gama
PV	Policitemia vera
qPCR	Pcr quantitativo em tempo real
RAR α	Receptor do ácido all-trans retinóico α
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SP	Sangue periférico
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Trombocitemia essencial
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial a
TFB1M	Fator de transcrição mitocondrial b1
TFB2M	Fator de transcrição mitocondrial b2
TOP1MT	Topoisomerase mitocondrial
TPO	Trombopoetina
TWINKLE	Helicase de mtdna
U/L	Unidades internacionais por Litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.2	Objetivo geral.....	20
1.1.3	Objetivos específicos.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM MIELOIDE.....	21
2.1.1	Leucemia Mieloide Aguda.....	21
2.1.1.1	Diagnósticos e classificação de LMA.....	23
2.1.1.2	Fatores Prognósticos e tratamento.....	26
2.1.2	Neoplasias mieloproliferativas.....	28
2.1.2.1	NMPs BCR/ABL1 negativa.....	29
2.1.2.1.1	<i>Policitemia Vera.....</i>	<i>32</i>
2.1.2.1.2	Trombocitemia essencial.....	33
2.1.2.1.3	<i>Mielofibrose primária.....</i>	<i>34</i>
2.1.2.2	Marcadores moleculares de clonalidade JACK 2, CALK e MPL.....	36
2.2	MITOCÔNDRIA.....	41
2.2.1	Estrutura e função.....	41
2.2.2	Replicação do mtDNA.....	43
2.2.3	Variações no número de cópias de mtDNA associado a carcionogênese.....	46
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1	CASUÍSTICA.....	50
3.2	ANÁLISE MOLECULAR.....	51

3.2.1	Extração do DNA genômico.....	51
3.2.2	Quantificação relativa do número de cópias do mtDNA.....	53
3.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS, CATEGORIZAÇÃO DOS GRUPOS E DESFECHO CLÍNICO.....	54
4	RESULTADOS.....	57
4.1	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE MTDNA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM LMA DE NOVO.....	57
4.2	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE MTDNA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM LPA.....	62
4.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE MTDNA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM NMPS PH- NEGATIVO.....	67
5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXO A – PARECER COSUBSTANCIADO DO CEP.....	87
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	88
	ANEXO C - CURRICULUM VITAE (LATTES).....	90

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias hematológicas de origem mieloide constituem um grupo heterogêneo de doenças clonais da medula óssea que comprometem progenitores hematopoiéticos, alterando a capacidade de responder à estímulos fisiológicos de proliferação, diferenciação e morte celular. A Organização Mundial de Saúde categoriza essas neoplasias primariamente quanto ao desfecho clínico em dois grandes grupos: neoplasias de curso agudo, tendo como seu representante mais comum a leucemia mieloide aguda (LMA), e as neoplasias de curso crônico, as quais podem ser subdivididas em quatro principais entidades, de acordo com sua frequência: leucemia mielóide crônica (LMC), Policitemia vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária (MFP). Achados morfológicos/citoquímicos/imunofenotípicos, presença de anormalidades citogenéticas recorrentes (translocações, inversões e deleções) e alterações moleculares específicas complementam e refinam essa classificação.

Embora não se conheçam as causas que levem um indivíduo a desenvolver uma neoplasia mieloide, estudos epidemiológicos sugerem que fatores genéticos e ambientais estejam envolvidos em sua patogênese, onde alterações genéticas cumulativas (modelo *multiple hit*) participam ativamente no desenvolvimento do fenótipo neoplásico. Essas alterações frequentemente envolvem eventos independentes que afetam fatores de transcrição mieloides, os quais controlam a diferenciação hematopoiética, e mutações ativadoras em intermediários da transdução de sinais, as quais conferem vantagens proliferativas e/ou de sobrevivência aos progenitores hematopoiéticos nos quais ocorrem. É importante destacar que essas alterações genéticas cumulativas (mutações e/ou alterações estruturais) mantêm-se apenas em células que

apresentam uma miríade de alterações que permita seu estabelecimento. Ou seja, o modelo de *multiple hit* evidencia a necessidade da criação de sucessivas alterações moleculares que repercuta em um ambiente nutricional, energético e molecular favorável para instalação da doença.

Conhecida pelo seu envolvimento em múltiplos processos celulares, principalmente no controle do metabolismo energético, a mitocôndria e o estudo do seu material genético (DNA mitocondrial, mtDNA) vem ganhando destaque nos últimos anos. Ao contrário do DNA nuclear, a replicação do material genômico mitocondrial ocorre de forma assincrônica com a replicação do material genômico nuclear, que atua em resposta às necessidades funcionais mitocondriais e estado geral para manutenção celular.

Nesse contexto, a literatura internacional mostra uma variedade de disfunções mitocondriais em células neoplásicas, em que variações quantitativas do número de cópias de mtDNA, apesar de maneira controversa, estão sendo associadas com a agressividade tumoral de diversos tipos de tumores sólidos. Já no que diz respeito a neoplasias hematológicas, a quantidade de relatos na literatura ainda é modesta, restringindo-se a poucos estudos relativo a doenças de origem linfóide e/ou linfomas. Com o intuito de contribuir com novas ideias sobre este tema, o presente projeto visa determinar o número de cópias de mtDNA em pacientes com diferentes neoplasias mielóides, com subsequente avaliação do impacto destes achados no desfecho e evolução clínica dos pacientes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar a associação entre o número relativo de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) com as características clínicas e laboratoriais, evolução clínica e desfecho de pacientes com neoplasias hematológicas de origem mieloide agudas e crônicas.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Categorizar os pacientes com neoplasias hematológicas de origem mieloides e indivíduos saudáveis (grupo controle) de acordo com o número relativo de cópias de mtDNA;

2. Associar o número relativo de cópias de mtDNA com o desfecho clínico (sobrevida, taxa de remissão completa, recidiva, evolução clonal e sintomas constitucionais), achados citogenéticos e moleculares nos pacientes com leucemia mieloide aguda *de novo*;

3. Associar o número relativo de cópias de mtDNA com características clínicas e laboratoriais de pacientes com NMP Ph-negativo;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM MIELOIDE

As neoplasias hematológicas de origem mieloide compreendem um grupo heterogêneo de doenças clonais que afetam progenitores hematopoiéticos, tornando-os incapazes de se diferenciarem terminalmente e de responderem aos estímulos fisiológicos de proliferação e morte celular (Focosi 2007). Por vezes, esses precursores podem apresentar uma proliferação anormal de uma ou mais linhagens mieloides, com consequente acúmulo de uma ou mais linhagens de células maduras mieloides no sangue periférico e tecidos, levando a complicações clínicas como organomegalia, trombose, hemorragia e potencial evolução para mielofibrose e leucemia aguda (Vardiman & Hyjek 2011).

Consideradas doenças de caráter genético esporádico, as neoplasias mieloides acometem indivíduos adultos de ambos os sexos em cerca de 90% dos casos aumentando significativamente sua incidência em indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) categoriza essas neoplasias quanto ao desfecho clínico (doenças agudas ou crônicas), achados morfológicos/citoquímicos/imunofenotípicos (presença de displasia em uma ou mais linhagens, origem do clone neoplásico e grau de maturação celular), presença de anormalidades citogenéticas recorrentes (translocações, inversões e deleções) e alterações moleculares específicas (mutações pontuais ou expressão gênica desbalanceada) (Vardiman JW, Thiele J 2008).

2.1.1 Leucemia Mieloide Aguda

A leucemia mieloide aguda é um conjunto heterogêneo de doenças de caráter clonal, caracterizada por uma parada na maturação mieloide e perda da

capacidade de resposta aos estímulos naturais de morte celular. Representando o tipo mais comum entre as leucemias agudas em adultos, correspondendo a cerca de 90% dos casos (Dores et al. 2012). Nos Estados Unidos, estima-se 21.380 novos casos de LMA para 2018. Já no Brasil de acordo com a última atualização do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi estimado 10.800 novos casos para 2018, entretanto o INCA reporta esses dados referentes às leucemias agudas no contexto global correspondendo tanto as de origem mieloide como as linfoides.

Acredita-se que o processo leucemogênico seja resultado de um processo multipasso que requer a colaboração de pelo menos duas classes de mutações genéticas distintas e aleatórias, mas que cooperam entre si para uma vantagem proliferativa e de sobrevivência, prejudicando a diferenciação celular e apoptose do clone hematopoiético (Gilliland 1998; Dash and Gilliland 2001; Gilliland and Tallman 2002). As mutações de classe I, que ativam vias de transdução de sinal e conferem vantagem proliferativa as células hematopoiéticas, e as mutações de classe II, que afetam fatores de transcrição e impedem a diferenciação hematopoiética. Mutações que afetam os genes *FLT3*, *KIT* e os da família *RAS* são consideradas mutações de classe I, enquanto que aberrações cromossômicas como t(8;21), inv(16) e t(15;17), que geram, respectivamente, os rearranjos gênicos *RUNX1/RUNX1T1* (também denominado *AML1/ETO*), *CBFB/MYH11* e *PML/RARA*, juntamente com as mutações nos genes *RUNX1*, *CEBPA* e *MLL* são consideradas dentro da classe II. De acordo com esse modelo, o acúmulo de mutações de classe I e II culminaria no desenvolvimento de progenitores hematopoiéticos transformados, capazes de propagar o fenótipo leucêmico (Kitamura et al. 2014).

2.1.1.1 Diagnóstico e classificação da LMA

O diagnóstico da LMA é iniciado a partir da observação do quadro clínico, em que os pacientes apresentam sintomas como fadiga, palidez, eventos hemorrágicos e organomegalia (esplenomegalia e hepatomegalia) que decorrem da falência medular e/ou proliferação excessiva pelas células leucêmicas que vão por conseguinte infiltrar órgãos e tecidos. Junto a esses achados, a análise citológica e molecular de amostras provenientes da medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP) dos pacientes com presença de pelo menos 20% de blastos leucêmicos e/ou alterações moleculares recorrentes como *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFB-MYH11* fecha o diagnóstico de leucemia aguda. Contudo, exames complementares como imunofenotipagem são essenciais para determinação da linhagem celular comprometida e análise da maturação celular, resultando no auxílio classificatório do subtipo de LMA e melhor conduta terapêutica são recomendados pela OMS. (Vardiman et al. 2015).

Devido a heterogeneidade clínica, biológica e molecular, vários grupos cooperativos foram motivados a estabelecer uma classificação para a LMA. A primeira foi realizada em 1976 pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), baseada estritamente nos aspectos morfológicos e citoquímicos do clone leucêmico, e assim categorizou seis subtipos de LMA (M1 a M6) (Bennett et al., 1976). Em 1985 essa classificação foi revisada, resultando na inclusão de dois novos subtipos (M0 e M7) aos seis já existentes, cujo diagnóstico também passou a levar em consideração os marcadores imunofenotípicos (Tabela 1). (Bennett et al., 1985, 1991).

Tabela 1 Classificação dos Subtipos de Leucemia mieloide aguda de acordo com os critérios estabelecidos pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB).

Classificação	Sinonímia	Características Morfológicas	Fenotipagem
M0	Leucemia mieloide aguda minimamente diferenciada	Blastos grandes, agranulares, indiferenciados, <3% para peroxidase e <i>sudan black</i>	13,33,34
M1	Leucemia mieloide aguda sem maturação	Blastos agranulares e granulares, com presença de bastonete de auer, > 3 peroxidase e <i>sudan Black</i>	13, 33
M2	Leucemia mieloide aguda com maturação	>10% de células maduras da linhagem neutrofílica	33, 13, 117,15
M3	Leucemia promielocítica aguda	Blasto com características de promielócitos podendo apresentar bastonetes de auer, peroxidase e <i>sudan black</i> fortemente positivos	13, 33
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	Componente monocítico >20% e <80% na MO e > 5.000 no SP	13, 14, 11b, 15
M5	Leucemia monocítica aguda	Componente monocítico >80%(M5a) e <80%(M5b)	14, 11b, 15
M6	Eritroleucemia	Componente eritroblástico >50%	Glicoforina A
M7	Leucemia megaloblástica aguda	30% das células são megacarioblastos	41

MO: Medula óssea; SP: Sangue periférico; M5a: subtipo a mielomonocítico; M5b: subtipo b mielomonocítico.

Fonte: Adaptado do grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) (Bennett et al.1991)

Apesar da sua relevância, a classificação FAB tornou-se obsoleta devido ao fato de não incorporar os achados citogenéticos e moleculares relevantes à fisiopatologia da doença. Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou uma classificação para as LMA que passava a incorporar os achados citogenéticos, e com isso introduziu uma correlação prognóstica importante para essa subdivisão (Heerema-Mckenney e Arber, 2009). Esse sistema logo se tornou insatisfatório, pois em cerca de 50% dos casos não é possível identificar nenhuma anormalidade citogenética, sendo esse grupo definido como citogeneticamente normal (LMA-CN). Neste grupo, são identificadas uma série de anormalidades a nível molecular, como mutações ou alterações de expressão em alguns genes, que estão associados à leucemogênese e à resposta clínica ao tratamento. Esses marcadores, juntamente com as alterações cromossômicas, ajudam a caracterizar

melhor os casos de LMA e refinam a estratificação de risco dos pacientes. Dentre esses marcadores, os mais estudados são as mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* (Mrozc *et al.*, 2007; Grimwade *et al.*, 2010; Rockova *et al.*, 2012). Diante disso, a OMS vem constantemente sendo atualizado de acordo com a descoberta de novos marcadores moleculares associados a fisiopatologia da doença, possibilitando uma melhor caracterização e refinamento da doença (Tabela 2) (Schlenk *et al.* 2008; Khasawneh and Abdel-Wahab 2014). (Tefferi and Vardiman 2008).

Tabela 2 Classificação dos subtipos de Leucemia mieloide aguda de acordo com a Organização Mundial de Saúde.

LMA com alterações genéticas recorrentes

LMA com t (8; 21) (q22; q22,1); *RUNX1-RUNX1T1*

LMA com inv (16) (p13.1q22) ou t (16; 16) (p13.1; q22); *CBFB-MYH11*

LMA com t(15;17) *PML-RARA* (LPA)

LMA com t (9; 11) (p21,3; q23,3); *MLLT3-KMT2A*

LMA com t (6; 9) (p23; q34,1); *DEK-NUP214*

LMA com inv (3) (q21.3q26.2) ou t (3; 3) (q21.3; q26.2); *GATA2, MECOM*

LMA (megacarioblasto) com t (1; 22) (p13.3; q13.3); *RBM15-MKL1*

Entidade provisória: AML com *BCR-ABL1*

LMA com *NPM1* mutado

LMA com mutações bialélicas de *CEBPA*

Entidade provisória: LMA com mutação de *RUNX1*

LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia

Neoplasias mieloides relacionadas com a terapia

LMA NE

LMA com diferenciação mínima

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia mielomonocítica aguda

Leucemia aguda monoblástica / monocítica

Leucemia eritróide

Leucemia megacarioblástica aguda

Leucemia aguda basofílica

Panmielose aguda com Mielofibrose

Sarcoma mieloide

Proliferação mieloide relacionada à Síndrome de Down

Mielopoese anormal transitória

Leucemia mieloide associada com a Síndrome de Down

LMA: Leucemia Mieloide Aguda; NE: não especificada

Fonte: Adaptado de Arber *et al.* 2016.

2.1.1.2 Fatores Prognósticos e tratamento

Os fatores prognósticos podem ser subdivididos entre aqueles relacionados às características do paciente e à sua condição de saúde geral, e aqueles relacionados às características do clone leucêmico. Os fatores do primeiro grupo são particularmente relevantes na predição da mortalidade relacionada ao tratamento e torna-se mais importante com o aumento da idade do paciente. Já os do segundo grupo são preditivos da resistência à terapia convencional (Liersch et al. 2014). Juntamente a esses achados, os resultados das análises citogenéticas e moleculares tem o papel não apenas como marcador diagnóstico para especificar subtipos de LMA, mas também constituem fatores prognósticos independentes para prever a remissão, o risco de recaída e a sobrevida global. Agrupando esses achados genéticos e os fatores prognósticos de estratificação em três grupos principais: aqueles com fator prognóstico favorável, intermediário (subdivido em I e II), e adverso (Tabela 3) (Mrózek et al. 2004; Grimwade and Mrózek 2011).

Tabela 3 Estratificação prognóstica segundo alterações genéticas em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda.

Risco	Alterações
Favorável	t(15;17)(q22;q12-21) t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutação Bial�lica <i>CEBPA</i> (Cariótipo Normal)
Intermediário I †	<i>NPM1</i> e <i>FLT3-ITD</i> Mutado (Cariótipo Normal) <i>NPM1</i> selvagem e <i>FLT3-ITD</i> mutado (Cariótipo normal) <i>NPM1</i> e <i>FLT3-ITD</i> selvagens (Cariótipo normal)
Intermediário II ‡	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KTM2A</i> Anormalidades citogenéticas não classificadas como favorável ou adversa
Adversa	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM (EVI1)</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); rearranjo <i>KMT2A</i> -5 ou del(5q); -7; abn(17p); Cariótipo complexo

† Esta categoria inclui todos os casos de LMA com cariótipo normal, exceto aqueles includidos no subgrupo favorável; a maioria destes casos estão associados com um pior prognóstico, mas eles devem ser apresentadas separadamente por causa do potencial de resposta diferente ao tratamento.

‡ Um número adequado da maioria das anormalidades não foram estudadas para firme conclusões sobre o seu significado prognóstico.

Fonte: Adaptado de European leukemia Net.

Os pacientes de risco favorável são os que mais se beneficiam da quimioterapia convencional com terapia p s-remissão como o uso de quimioterápicos para a consolida o da remissão. Os pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) portadores da t(15;17) são os que mais se beneficiam da quimioterapia convencional, em que se tornaram um subtipo distinto da leucemia mieloide aguda com a descoberta dos quimioterápicos trioxido de ars nico e citarabina, devido sua ótima resposta clínica ao tratamento com taxas de remissão molecular de 60-88% (Schlenk *et al.*, 2004; Yanada *et al.*, 2005; Koreth *et al.*, 2009). Já os pacientes de risco intermediário a terapia convencional tem sido amplamente utilizada por grupos cooperativos, mas para alguns pacientes foram observados resultados insatisfatórios, no qual foi visto que o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico pode ser uma op o atrativa para aqueles pacientes do grupo intermediário que apresentam

altas chances de recaída, em particular para os que apresentam a mutação *FTL3/ITD* (Schlenk *et al.*, 2008; Dohner *et al.*, 2010). Enquanto que os pacientes do grupo de risco adverso, é considerado que o tratamento de escolha para a terapia pós-remissão deva ser o TCTH alogênico, uma vez que eles não se beneficiam com a quimioterapia convencional (Yanada *et al.*, 2005; Koreth *et al.*, 2009).

2.1.2 Neoplasias mieloproliferativas

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são doenças hematológicas originadas de uma alteração clonal da célula tronco hematopoiética e são caracterizadas pela proliferação descontrolada, independente de estímulos regulatórios de células maduras da linhagem mieloide (Vardiman and Hyjek 2011). Contudo, pode ocorrer hiperplasia da linhagem eritróide ou megacariocítica, tendo como consequência um acúmulo de uma ou mais linhagens de células maduras mieloides no sangue periférico e tecidos, levando a complicações clínicas como: organomegalia, trombose, hemorragia e potencial evolução para fibrose medular e leucemia aguda. (Kvasnicka 2013)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece oito entidades como NMPs clássica, na qual se destacam: a leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP) devido a sua maior prevalência (Tabela 4). Apesar de serem classificadas em diferentes entidades, as NMPs compartilham algumas características fisiopatológicas comuns. Isso se deve, ao fato de que esta proliferação anormal dos componentes mieloides surge a partir de vias de sinalização celular constitutivamente ativadas que afetam mecanismos de controle de proliferação celular e apoptose (Arber et al. 2016).

Tabela 4. Classificação das Neoplasias mieloproliferativas de acordo com a OMS.

Neoplasias mieloproliferativas

Leucemia mieloide crônica (LMC) *BCR-ABL*⁺
 Leucemia neutrofílica crônica (LNC)
 Policitemia vera (PV)
 Mielofibrose primária (MFP)
 MFP, Pré-fibrótica/ estágio inicial
 MFP, Pós-fibrótica
 Trombocitemia essencial
 Leucemia eosinofílica crônica inclassificável
 NMP inclassificável
 Mastocitose

Neoplasias mieloide/linfóide associadas com eosinofilia e rearranjos com os genes *PDGFRA*, *PDGFRB*, ou *FGFR1*

Neoplasias mielóides / linfóides com rearranjo de *PDGFRA*
 Neoplasias mielóides / linfóides com rearranjo de *PDGFRB*
 Neoplasias mielóides / linfóides com rearranjo *FGFR1*
 Entidade provisória: Neoplasias mielóides / linfóides com *PCM1-JAK2*

Neoplasias mielodisplásicas / mieloproliferativas (SMD /NMP)

A leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)
 Leucemia mieloide crônica atípica (aLMC), *BCR-ABL*¹²
 A leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ)
 SMD / NMP com sideroblastos em anel e trombocitose
 SMD / NMP, inclassificável

SMD: Síndrome mielodisplásica

Fonte: adaptado de Arber et al. 2016

2.1.2.1 NMPs *BCR/ABL1* negativa

Por convenção, essas neoplasias podem ser reagrupadas segundo mutações e/ou rearranjos de genes codificadores de tirosina quinases, dos quais se destacam o gene *ABL1*, frequentemente associado à translocação cromossômica t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1* ou cromossomo philadelphia (Ph), e o gene *JAK2*, envolvendo principalmente uma mutação somática no domínio regulatório da proteína Janus quinase 2, que consiste na substituição de uma valina por fenilalanina no códon 617 (*JAK2V617F*), além de mutações adicionais no éxon 12. Quando agrupadas de acordo com essas alterações genéticas, no primeiro grupo (Ph-positivo) destaca-se a LMC como principal entidade, enquanto que no segundo grupo (Ph-negativo), enquadram-se a PV, TE e MFP, as quais estão frequentemente associadas à mutação *JAK2V617F* (Tefferi and Vardiman

2008). Em conjunto, a incidência anual das NMPs Ph-negativo, é de 0,5 a 2,5 casos por 100.000 habitantes. Clinicamente, essas doenças caracterizam-se por graus variados de eritrocitose, trombocitose, leucocitose, organomegalia secundária à hematopoiese extramedular, trombose e hemorragia. Em estágio tardio, esta mieloproliferação descontrolada pode resultar em mielofibrose grave e transformação para leucemia aguda (Tefferi and Vardiman 2008; Vardiman & Hyjek 2011).

A identificação de marcadores coletivos clonais em genes como JAK2, CALR e MPL é considerada como principais achados moleculares nas NMPs Ph-negativos, em que a mutação JAK2V617F permitiu um critério diagnóstico mais objetivo, juntamente com a clínica do paciente, como exemplo, a avaliação do desenvolvimento de complicações cardiovasculares ou esplenomegalia, alterações laboratoriais específicas, observadas pelo hemograma, mielograma ou biópsia da medula óssea (Figura 1).

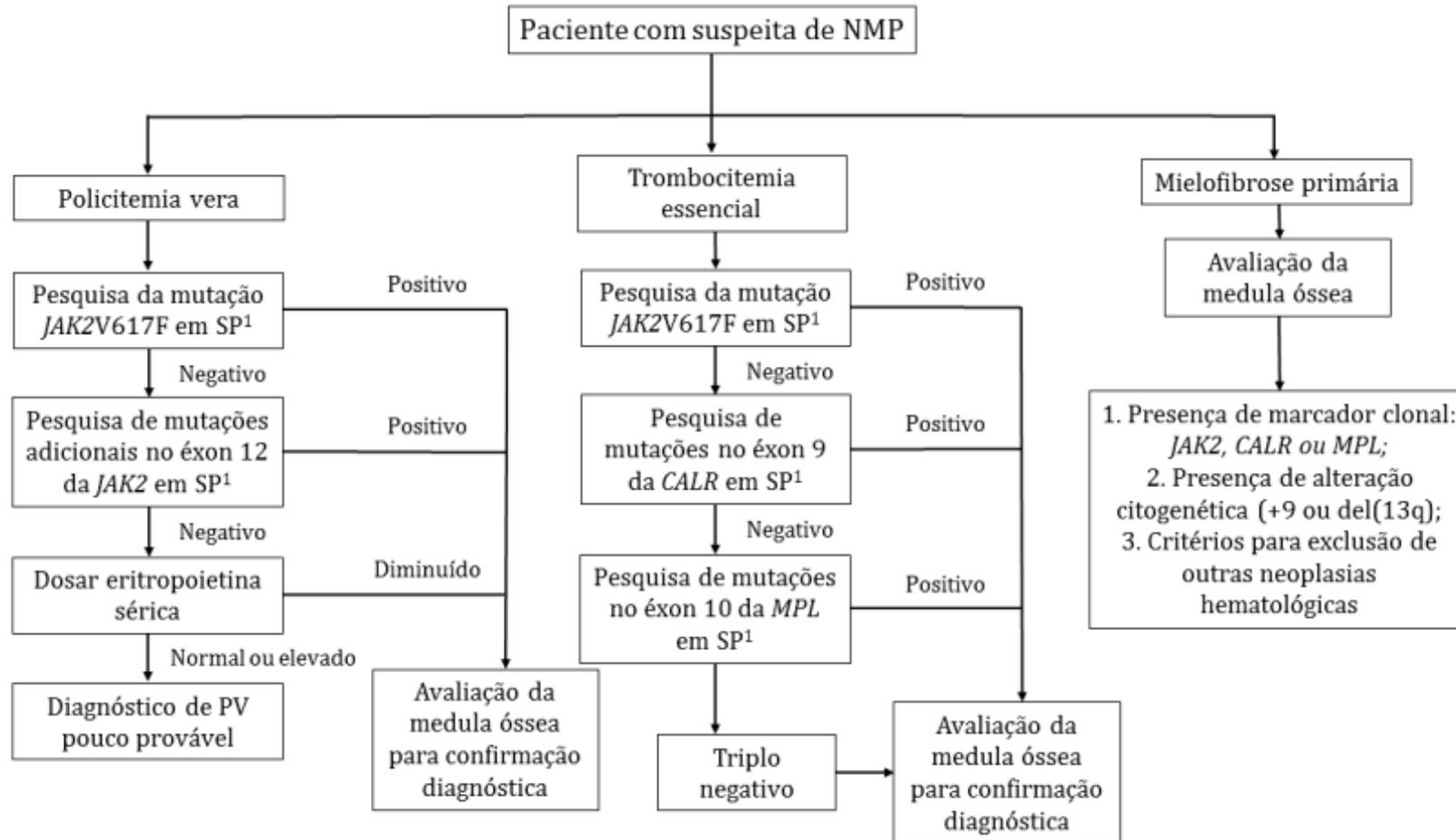


Figura 1 Algoritmo de investigação clínica de pacientes com neoplasias mieloproliferativas Ph-negativas preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Relatando os principais achados clínicos de forma hierarquizada. Modificado de Tefferi & Pardanani, 2015.

2.1.2.1.1 *Policitemia vera*

A PV possui incidência anual de 0,7-2,6 casos por 100.000 habitantes, tendo como principal característica o aumento do número de hemácias (eritrocitose), e comumente acompanhado do aumento simultâneo de plaquetas (plaquetose) e leucócitos (leucocitose), clinicamente sumarizado como panmielose no sangue periférico (Angona et al. 2015). É importante destacar que esta expansão é independente de eritropoietina (hormônio regulador da eritropoiese fisiológica). Atualmente, aceita-se que a desregulação molecular da via JAK-STAT, majoritariamente causada por mutações em *JAK2*, é a responsável pela etiopatogenia da PV (Geyer et al. 2014).

Com curso clínico normalmente assintomáticos, os pacientes portadores de PV são diagnosticados após algum evento tromboembólico ou por meio de algum achado sugestivo em exame laboratorial realizado com outra finalidade (Tabela 5). Aproximadamente 30 a 40% dos pacientes apresentam sintomas constitucionais, em que se destacam a cefaleia, prurido, fraqueza, sudorese noturna e tontura (Nemer et al. 2014).

Tabela 5. Critérios diagnóstico para Policitemia vera preconizados pela OMS.

Entidade	Critérios maiores	Critérios menores
Policitemia vera	1: Hemoglobina >18,5 g/dL (Homens); > 16,5 g/dL (Mulher).	Biópsia de MO evidenciando panmielose
	2. Identificação de marcador clonal <i>JAK2V617F</i>	Eritropoietina sérica diminuída
	3. Panmielose em biopsia de MO com pleomorfismo da linha megacariocítica	Avaliação de formação de colônia eritróide <i>In Vitro</i>
- Requer ao menos dois critérios maiores e ao menos um menor		
MO: Medula óssea; PV: Policitemia vera;		
Fonte: adaptado de Arber et al. 2016		

2.1.2.1.2 Trombocitemia essencial

A TE possui incidência anual de 0,2 a 2,27 casos a cada 100.000 habitantes e envolve, principalmente, o comprometimento da linhagem megacariocítica, sendo caracterizada por um aumento sustentado e persistente da contagem de plaquetas ($>450 \times 10^9/L$) no sangue periférico, exacerbação da megacariopoese e por episódios clínicos de trombose e/ou hemorragia (Tefferi and Barbui 2015).

Por não possuir um marcador genético ou biológico específico para TE, outras causas de plaquetose precisam ser excluídas, incluindo outras NMPs como à Mielofibrose pré-fibrótica, em que o principal achado para o diagnóstico diferencial é a ausência de fibras de reticulínicas por meio da biopsia de MO nos pacientes com TE (OMS, 2008; Tefferi et al 2015). As principais manifestações estão associadas às complicações cardiovasculares, em que se destacam os eventos trombóticos e hemorrágicos (Kiladjian 2012). Contudo, aproximadamente metade dos pacientes com TE são assintomáticos ao diagnóstico (tabela 6) (Lekovic et al. 2015).

Tabela 6. Critérios diagnóstico para Trombocitemia essencial preconizados pela OMS.

Entidade	Critérios maiores	Critérios menores
Trombocitemia essencial	1: Plaquetas $>450 \times 10^9/L$	
	2. Biópsia de MO apresentando hiperplasia da linhagem megacariocítica atípica	
	3. Não possuir nenhum critério classificatório para outras NMPs (LMC, PV, MFP, SMD ou outra NMPs inclassificável)	1. Presença de um marcador clonal ou ausência de evidências de trombocitose reativa
	4. Identificação de marcador clonal (<i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou, <i>CALR</i>)	
O diagnóstico requer todos os 4 critérios maiores ou os 3 primeiros maiores e o menor		

MO: Medula óssea; LMC: Leucemia mieloide crônica; Policitemia vera; SMD: Síndrome mielodisplásica; MFP: Mielofibrose primária; NMPs: Neoplasia mieloproliferativas
 Fonte: adaptado de Arber et al. 2016

2.1.2.1.3 Mielofibrose primária

A MFP tem incidência de 0,1 a 1,0 caso para cada 100.000 habitantes/ano, e é caracterizada por um quadro leucoeritroblástico (presença de precursores eritróides e leucocitários no sangue periférico), leucocitose e/ou citopenias, fibrose medular progressiva e hematopoiese extramedular acompanhada de esplenomegalia (OMS 2008). Podendo ter origem *de novo* caracterizada pela clássica MFP ou originadas da evolução clonal da PV ou TE (MF pós-PV/TE) (Mascarenhas et al. 2013). Entre as NMPs *BCR/ABL1* negativas, a MFP é a entidade que apresenta maior risco de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA), ocorrendo em até 20% dos pacientes em 10 anos de seguimento (Gangat et al. 2011). Assim como as demais NMPs, a mielofibrose primária apresenta complicações clínicas decorrentes de problemas cardiovasculares (Finazzi et al. 2013).

Com a nova atualização da OMS em 2016, a MFP foi subdividida em pré-MFP e MFP, tendo um grande impacto não apenas no diagnóstico preciso, mas

também no prognóstico, em que o grau de fibrose medular é de essencial importância estadiamento (Tabela 7).

Tabela 7. Critérios diagnósticos para Mielofibrose primária preconizados OMS.

Entidade	Critérios maiores	Critérios menores
Pré-mielofibrose primária	1. Proliferação de megacariócitos e atipia, sem fibrose reticulínica maior que Grau 1, acompanhada de aumento da celularidade da MO ajustada pela idade, proliferação granulocítica e, frequentemente, diminuição da eritropoiese	1. Anemia não atribuída a uma comorbidade. 2. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$
	2. Não possuir nenhum critério classificatório para outras NMPs (LMC, PV, MFP, SMD ou outra NMPs inclassificável)	3. Esplenomegalia palpável
	3. Presença de mutação JAK2, CALR ou MPL e/ou presença de outro marcador clonal.	4. aumento do LDH acima do limite normal superior.
	O diagnóstico de pré-MFP requer a todos os três critérios maiores, e pelo menos um critério menor	
Mielofibrose primária	Presença de proliferação megacariocítica e atipia, acompanhada por reticulina e / ou fibrose colágena grau 2 ou 3	Presença dos seguintes critérios devem ser confirmadas em 2 determinações consecutivas: 1. Anemia não atribuída a uma comorbidade. 2. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$
	Não possuir nenhum critério classificatório para outras NMPs (LMC, PV, MFP, SMD ou outra NMPs inclassificável)	3. Esplenomegalia palpável
	Presença de mutação JAK2, CALR ou MPL e/ou presença de outro marcador clonal.	4. aumento do LDH acima do limite normal superior. 5. Quadro leuco/eritoblastico no sangue periférico
	O diagnóstico de MFP requer todos os três critérios maiores, e pelo menos um critério menor.	

MO: Medula óssea; LMC: Leucemia mieloide crônica; Policitemia vera; SMD: Síndrome mielodisplásica; MFP: Mielofibrose primária; NMP: Neoplasia mieloproliferativas; LDH: lactato desidrogenase

Fonte: Adaptado de Arber et al. 2016

2.1.2.2 Marcadores moleculares de clonalidade: JAK2, CALR e MPL

As entidades NMPs Ph-negativo estão estratificadas primariamente por alterações na via JAK/STAT, na qual a mutação p.Val617Phe (JAK2V617F) está presente em torno de 95% dos pacientes com PV e 50% dos pacientes com TE e MFP. Nos 50% restantes (JAK2V617F negativos) destacam-se mutações no gene do receptor da trombopoietina (MPL), mutado em aproximadamente 10% dos casos de TE e MFP. Já entre os pacientes duplo negativos (JAK2 e MPL), mutações no gene da CALR apresentam-se com uma frequência entre 20 a 25%, preenchendo uma lacuna diagnóstica importante nos pacientes JAK2V617F negativos. Apesar de raros casos de co-ocorrência, essas mutações são eventos predominantemente mutuamente exclusivas (Figura 2) (Baxter et al. 2005; James et al. 2005; Kralovics et al. 2005; Levine et al. 2005; Zhao et al. 2005).

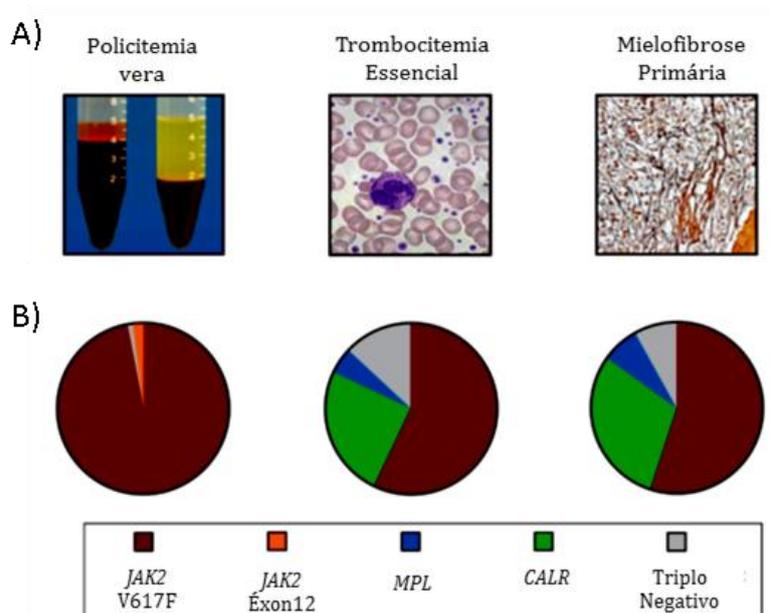


Figura 2 Contextualização entre principais manifestações laboratoriais e distribuição da frequência molecular nas NMPs Ph-negativas. (A) Principais características clínicas inerentes a cada entidade. Na PV, destacamos a eritrocitose como principal sinal clínico. Como principais características na TE e MFP, são destacadas a trombocitose e a deposição de fibras reticulínicas na medula óssea, respectivamente. (B) A mutação JAK2V617F são encontradas em 97% dos pacientes com PV e em 50%-60% daqueles com TE e MFP. Mutações no gene da CALR afetam ~34% dos pacientes com TE e MFP. Mutações no gene MPL encontra-se em torno de 3%-10% dos pacientes com TE ou MFP. Essas mutações são mutuamente exclusivas na maioria dos pacientes. Nos pacientes com TE e MFP 10%-15% dos casos não possuem um marcador genético identificado. **Fonte:** Modificado de Nangalia & Green 2014

A mutação somática de maior frequência nas NMPs Ph-negativo é a p.Val617Phe (JAK2 V617F) (Baxter et al. 2005; Kralovics et al. 2005; Zhao et al. 2005; Lundberg et al. 2014; Zhang et al. 2015), localizada no éxon 14 do gene *JAK2* (localização 9p24), em que há a substituição de uma guanina por uma timina, resultando na troca de uma valina por fenilalanina na posição 617 da cadeia de aminoácidos da proteína. A presença da JAK2V617F está associada à ativação constitutiva da proteína JAK2, um receptor do tipo tirosina-quinase responsável pela transdução de sinais de proliferação e divisão celular (figura 3a) (Chen and Mullally 2011; Toms et al. 2014).

A função efetora da JAK2 é desempenhada por sua região JH1, na qual possui atividade catalítica de tirosina quinase que é regulada pelo domínio JH2 da JAK2, que exerce sobre ela função pseudoquinase, ou seja, a região JH2 atua impedindo a ativação indiscriminada mediada pela região JH1 (Figura 3 b) (Nangalia and Green 2014a; Toms et al. 2014). Mutações adicionais localizadas no éxon 12 do gene *JAK2* também estão envolvidas na patogênese das NMPs, em especialmente a PV (Scott et al. 2007). Similarmente, mutações no éxon 12 envolvem a região JH2 onde também ocorre a perda do controle negativo (Grünebach et al. 2006; Schnittger et al. 2006; Lee et al. 2009; Ma et al. 2009)

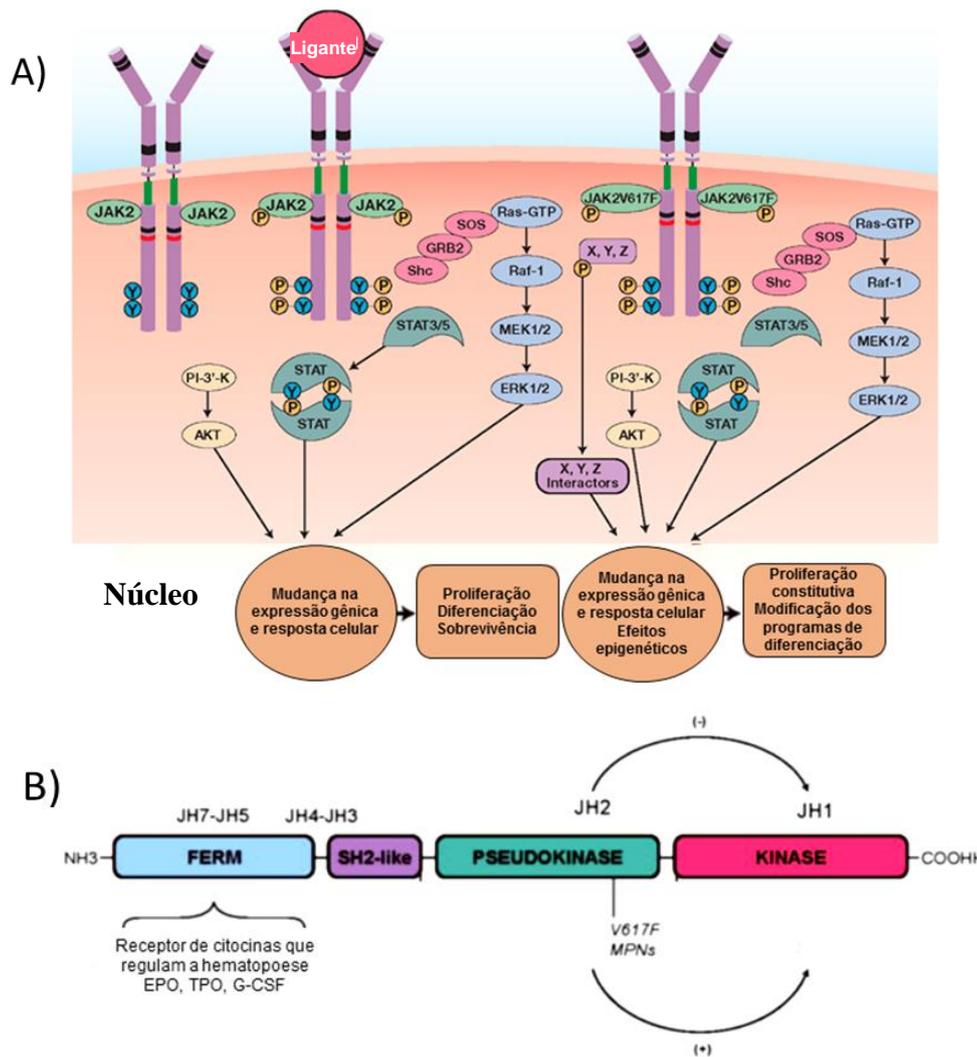


Figura 3. Patogênese relacionada à JAK2V617F. A) Cascata de sinalização regulada pela ativação da JAK2. Sumariamente, a ativação da sinalização pelo ligante, deflagra sinais de proliferação via proteínas STATs. A vantagem proliferativa conferida pela JAK2V617F é o paradigma para compreensão da patogênese das NMPs Ph-negativo, uma vez que justifica a proliferação celular descontrolada e a inibição de sinais pró-apoptóticos. B) Estrutura sequencial da proteína JAK2, em que se nota a proximidade entre os domínios JH1 e JH2. Fisiologicamente, o domínio pseudoquinase (JH2) exerce controle negativo sob o domínio catalítico JH1. A mutação V617F causa um dano que impede JH2 exercer sua função. O domínio “FERM” é a região responsável pela ligação dos fatores que regulam a hematopoese, aqui listados como Eritropoietina (EPO), Trombopoetina (TPO) e Fator Estimulante de Colônias Granulocíticas (G-CSF). A sinalização constitutiva da JAK2, mediada pela mutação V617F, torna, portanto, a célula independente destes fatores de crescimento. As mutações no éxon 12 também comprometem a função do domínio JH2. FONTE: Modificado de Vainchenker & Constantinescu 2012

O gene da *CALR* localizado no cromossomo 19, contém 9 éxons e extensão de 4,6kb. Este codifica uma proteína, a calreticulina, uma chaperona multifuncional ligante de cálcio, de localização luminal no retículo endoplasmático

(Gardai et al. 2005). Recentemente, mutações somáticas do tipo *Frameshift* (inserções ou deleções-indels) foram descritas no gene *CALR* em pacientes com NMPs Ph-negativo (Nangalia et al. 2013b; Chi et al. 2014; Woods and Levine 2015). Aproximadamente 40 diferentes indels foram relatados, restritos ao éxon 9, sendo os mais frequentes, uma deleção de 52pb, chamado de tipo 1, e uma inserção de 5pb (TTGTC) denominado tipo 2 (Tefferi et al. 2014). Os *indels* em *CALR* estão presentes em aproximadamente 67-82% dos pacientes com TE e 80-88% dos pacientes com MF negativos para a mutação no gene da *JAK2* e *MPL* (Klampfl et al. 2013; Nangalia et al. 2013).

Quanto às características clínicas e laboratoriais dos pacientes com mutações em *CALR*, é descrita a associação positiva entre menores níveis de hemoglobina e leucócitos; níveis elevados de plaquetas; risco diminuído para trombose e maior sobrevida em pacientes com TE. Na MF, as referidas mutações estão associadas à leucopenia, trombocitose e melhores índices de sobrevida (Woods and Levine 2015). O desenvolvimento de trombocitose, combinada com a observação prévia de que *CALR* tipo 1 induz uma ativação constitutiva de sinalização JAK/STAT, podendo sugerir que a atividade oncogênica da *CALR* mutante é mediada através do *MPL*, estudos in vivo realizados com camundongos confirmaram esses dados, relatando que os mutantes *CALR* interagem com *MPL* e ativam *JAK2* e os STATs independentemente de TPO, embora o TPO contribua para penetrância da doença (Marty et al. 2016).

O receptor de trombopoetina (TPOR) que é codificado pelo gene *MPL* (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*) localizado no cromossomo 1, locus p24 é responsável pela transdução de sinais na via JAK-STAT, estimulando a proliferação e diferenciação megacariócítica quando a trombopoetina liga-se ao

seu receptor (MPL/TopR) (Steensma et al. 2006; Nangalia et al. 2013a). Mutações no éxon 10 do gene *MPL* tem sido associada com NMPs. As mais frequentes estão localizadas no códon 515 (W515L/K) na região justamembranar do receptor. Entretanto, várias outras substituições têm sido descritas como W515R, W515A e W515G (Defour et al. 2016).

Usualmente, as mutações em *MPL* estão presentes em pacientes *JAK2V617F* negativos, sem, contudo, serem eventos mutuamente exclusivos. A prevalência de mutações neste gene é de 10% em pacientes com MFP e de 5% nos pacientes com TE (Beer et al. 2008). Restando uma pequena parcela de pacientes com suspeita clínica de NMPs (16,5% dos pacientes com TE e 10% dos pacientes com MF) que não pode ser caracterizada do ponto de vista molecular para conclusão diagnóstica, e estratificação quanto ao risco de evolução clonal e/ou desenvolvimento de complicações (Woods and Levine 2015). Com isso, desde a descoberta do cromossomo Philadelphia em 1960, em que se relacionou um envolvimento molecular de quimerismo entre os genes BCR e ABL1 como sendo causador da LMC, as investigações na descoberta e inclusão de novos marcadores moleculares envolvidos na biologia e consequência clínica nas neoplasias são de grande importância para estratificação prognóstica, predição e novos alvos terapêuticos (Passamonti et al. 2016).

2.2. MITOCÔNDRIA

2.2.1 Estrutura e função

As mitocôndrias são organelas celulares citoplasmáticas originadas evolutivamente da endossimbiose com procariotos, e encontradas em todas as células eucariotas. Constituída por uma membrana externa mitocondrial (MEM), lisa e esférica, e uma membrana interna (MIM) com numerosas cristas que delimitam o espaço intramitocondrial (matriz) (Kuroiwa et al. 2006). São responsáveis por inúmeras funções indispensáveis para vida da maioria das células eucarióticas, podendo destacar a produção de ATP gerada através da via do ciclo de Krebs e o sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS); e biossíntese de muitos metabólitos como pirimidinas, aminoácidos e proteínas (Mishra and Chan 2016). Além do seu papel na biossíntese, as mitocôndrias têm papel importante no balanço redox celular, na homeostase do ions de Ca^+ e na sinalização celular, particularmente na regulação da morte celular via apoptose por meio de fatores proapoptóticos mitocondriais como o citocromo C (Hengartner 2000; Yang et al. 2017).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é haploide, de herança exclusiva materna com aproximadamente 16.7kb e apresenta-se em cadeia dupla, formada por uma cadeia leve (L), majoritariamente constituída por citosinas, e uma cadeia pesada (H), muito rica em guanina (figura 4). Apresenta 37 genes, dos quais 13 codificam proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons ou na fosforilação oxidativa (complexo I: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6;Complexo III: CYTB; Complexo IV: COXI, COXII e COXIII; e Complexo V: ATP6 e ATP8.), 22 tRNAs e 2rRNAs mitocondriais (Falkenberg et al. 2007).

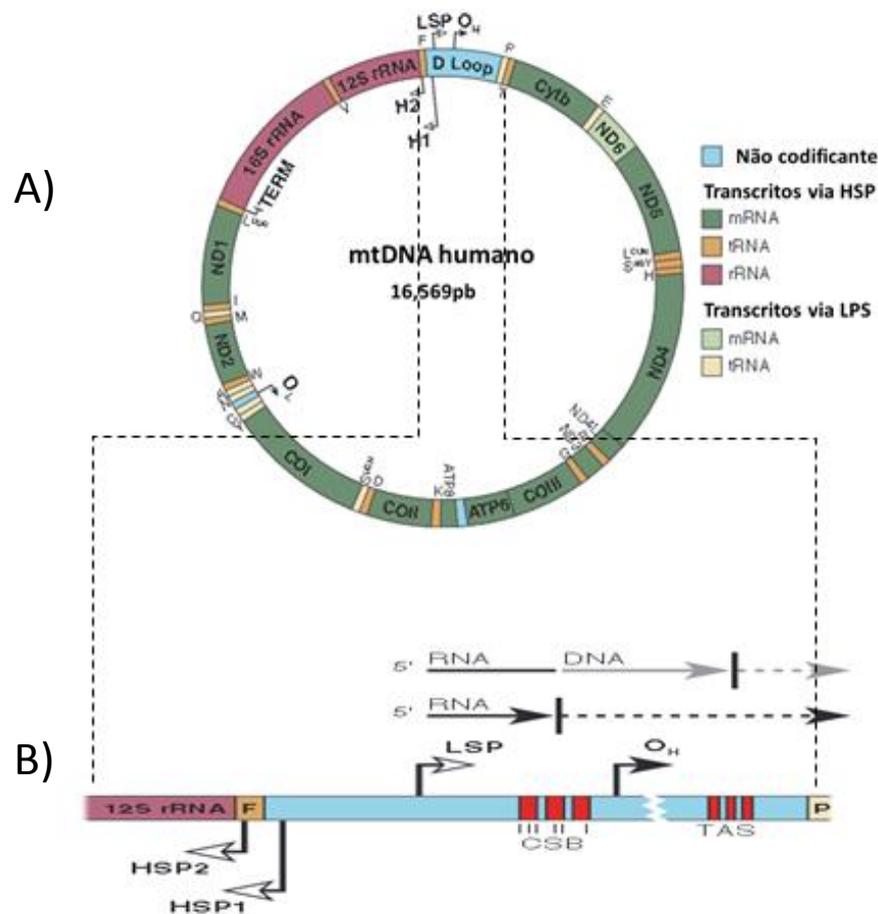


Figura 4. Representação do DNA mitocondrial humano. (A) DNA mitocondrial humano e (B) Detalhamento da região regulatória (D-loop) do DNA mitocondrial. LSP: Região promotora da fita leve; O_H : Origem de replicação da fita pesada; HSP1; HSP2: Região promotora 1 e 2 da fita pesada; CSB I, II, III: Blocos de sequências conservadas; TAS: sequências associadas a terminação. **Fonte:** Modificado de Falkenberg et al 2007

O D-loop, denominado de laço de deslocamento, é a única região não codificadora do mtDNA, o qual contém as sequências regulatórias para a transcrição, replicação e as regiões hipervariáveis. A replicação e a segregação do mtDNA são radicalmente diferentes do genoma nuclear, em que é constantemente replicado na matriz mitocondrial, independentemente do ciclo celular (Falkenberg et al. 2007). Apesar do fato que as mitocôndrias possuem seu próprio DNA e uma replicação à parte da replicação do material genético nuclear, a maior parte das proteínas localizadas na mitocôndria são codificadas

pelo núcleo. Assim, existindo a dependência de fatores nucleares para sua replicação, como por exemplo a polimerase γ que é responsável pela replicação genética mitocondrial mas que tem origem nuclear e sofre fortes influências da localização, proliferação e metabolismo geral da célula (Copeland and Longley 2014).

2.2.2 Replicação do mtDNA

Existem dois modelos para explicar a replicação do mtDNA. O primeiro modelo foi proposto por Clayton, que descreve um processo de replicação assíncrono na origem da cadeia H (O_H), onde a síntese da fita pesada é unidirecional, percorrendo até a origem da fita da cadeia leve (O_L), que inicia a replicação da fita L na direção oposta (Clayton 1982). Já no modelo proposto primariamente por Holt, a replicação é iniciada em uma única origem de replicação de forma simétrica e bidirecional (figura 5) (Holt et al. 2000).

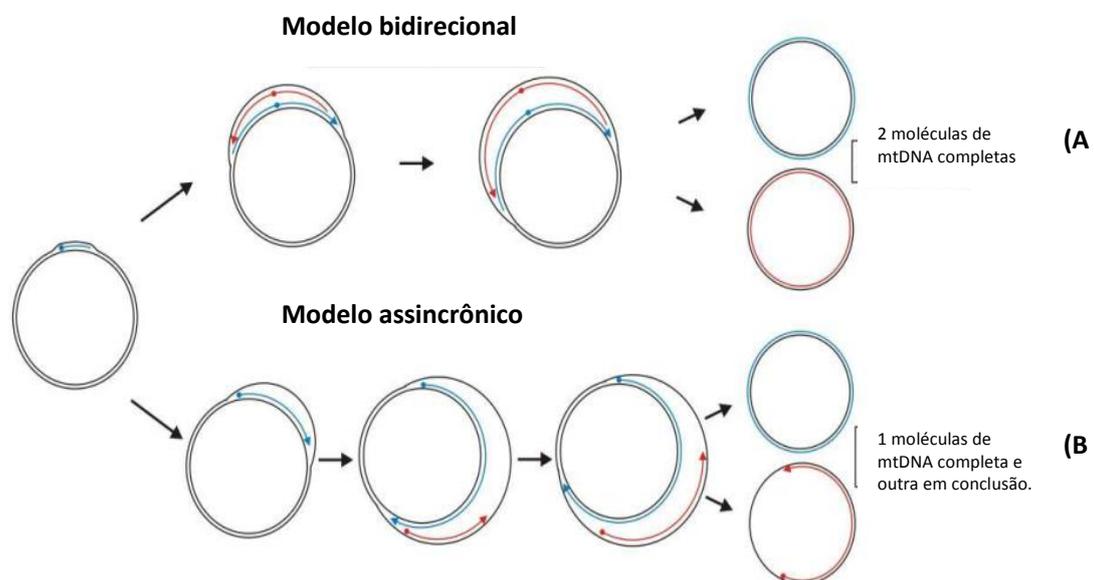


Figura 5. Modelos de replicação do DNA mitocondrial humano. (A) modelo bidirecional e (B) modelo de replicação assíncrono. **Fonte:** Adaptado de Graziewicz et al., 2006

Independente do modelo adotado, a replicação se inicia com o recrutamento do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) que se liga às regiões

acentuadoras na origem de replicação e induz alterações estruturais no mtDNA expondo a região promotora (Wanrooij and Falkenberg 2010). A RNA polimerase mitocondrial (mtRNAPol) e os fatores de transcrição mitocondrial B1(TFB1M) e B2(TFB2M) são recrutados e auxiliam no início da transcrição do mtDNA que subsequentemente geram um iniciador híbrido RNA-DNA que será utilizado pela polimerase gama (POLG), exclusiva para replicação do mtDNA (Kanki and Ohgaki 2004). Composta por duas subunidades, a POLG-A, que é a parte catalítica com função de sintetizar a nova fita, e a subunidade POLG-B, que é subdividida em mais duas unidades, uma com atividade acessória no reconhecimento do iniciador híbrido e a outra responsável na alta fidelidade, atuam com o auxílio de outros fatores como as helicase de mtDNA (TWINKLE), proteínas de ligação a fita simples de mtDNA (mtSSB) e a topoisomerase mitocondrial (mtTOP1) que alivia a tensão gerada pela torção durante a replicação (figura 6) (Kasiviswanathan et al. 2012).

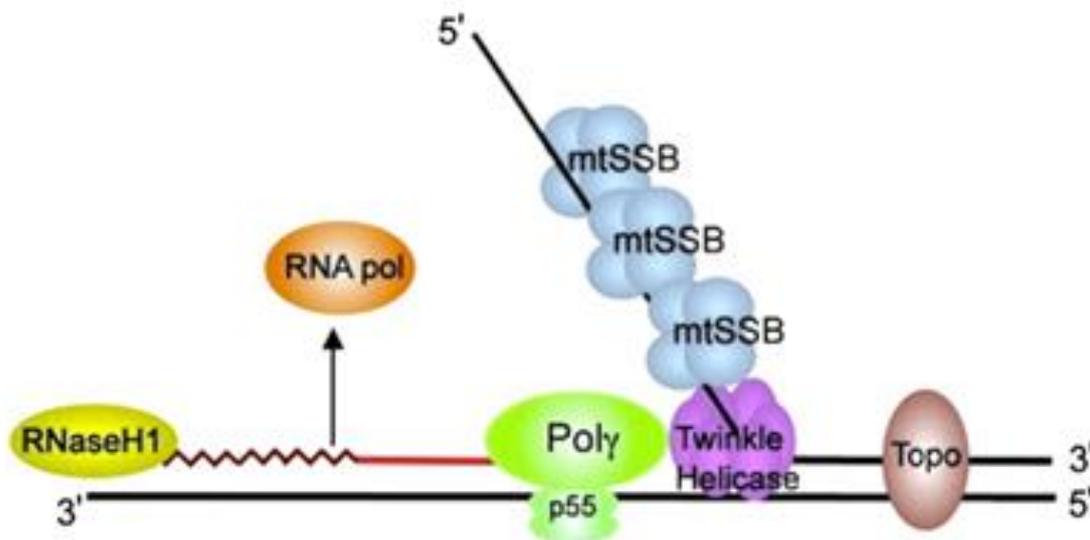


Figura 6. Diagrama esquemático de uma forquilha de replicação do DNA mitocondrial mostrando as proteínas essenciais para replicação. O DNA recém-sintetizado (linha vermelha), enquanto o iniciador (linha dentada marrom) criado pela RNA polimerase mitocondrial (Laranja) está sendo degradado pela RNase H1 (amarelo). A helicase mitocondrial (roxo) desenrola o DNA a jusante formando cadeias simples fita, que é revestido por mtSSB (azul). AS topoisomerases (marrom) trabalham para aliviar a tensão de torção criada pelo desenrolamento da fita feito pelas helicases. **Fonte:** modificado de Kasiviswanathan et al. 2012

Desde as células germinativas é observado que se houver uma desregulação na replicação do mtDNA durante a maturação do ovócito, onde nessas células o número de cópias vai aumentando significativamente para preparação da fertilização, resulta em problemas na progressão do desenvolvimento (Spikings et al. 2007). A medida que a divisão celular progride no blastocisto, o número de cópias de mtDNA é significativamente reduzido favorecendo ao processo de implementação, onde a presença de altos níveis de mtDNA no blastócito durante essa fase está relacionado com falhas na implantação ao endométrio (Chappel 2013). Após a adesão dessa massa celular indiferenciada pluripotente (blastócito), ocorre a ativação de genes que estão intimamente relacionados com a perda da pluripotência celular, que incluem os genes *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*. Dessa forma, observa-se uma reativação da

replicação do material mitocondrial, progredindo até o final da diferenciação celular com valores quantitativos de mtDNA específicos de acordo com a funcionalidade da célula (Figura 7) (Loh et al. 2006; Wray et al. 2010). Em células somáticas, cada mitocôndria possui em torno de 2-10 cópias de mtDNA, podendo variar consideravelmente dependendo do tipo de célula, estágio de diferenciação, tecido, atividade metabólica, resposta ao estresse oxidativo e condições patológicas (Xin Sun and St John 2016).

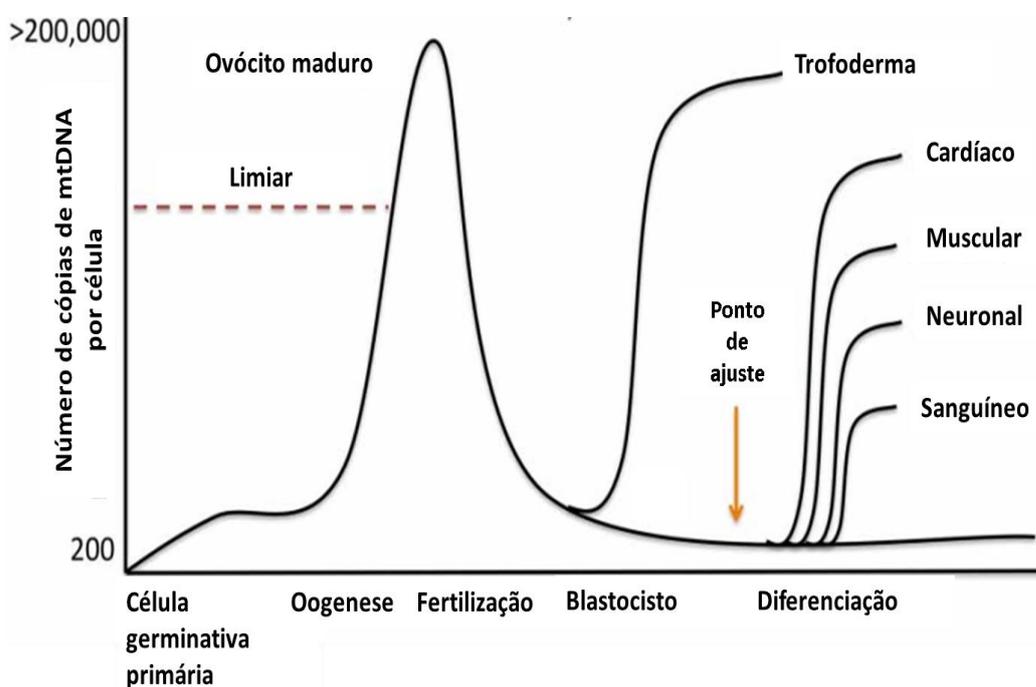


Figura 7. Variação do número de cópias de mtDNA ao longo do desenvolvimento embrionário. O número de cópias de mtDNA aumenta durante a oogênese, onde atinge o pico na fertilização e diminui até ao estágio de blastocisto. É reativada inicialmente no trofoderma. Quando as células se comprometem com uma linhagem específica, elas replicam o mtDNA suficientemente para realizar suas funções naquele subtipo celular. **Fonte:** modificado de Xin Sun and St John 2016

2.2.3 Variações no número de cópias de mtDNA associado a carcinogênese

A tumorigênese é um processo complexo que envolve principalmente alterações na proliferação celular e mecanismos de apoptose. Essas modificações são geradas por progressivas alterações cromossômicas e gênicas bem estabelecidas, responsáveis pela proliferação (oncogenes e supressores

tumorais) e apoptoses, que levam a transformação e progressão neoplásica (Hanahan and Weinberg 2000).

Desde à descoberta que a mitocôndria possuía seu próprio material genético, essa informação trouxe consigo a associação de alterações qualitativas e quantitativas do mtDNA a diversas doenças como: ataxia, baixa estatura e cardiomiopatia (Area-Gomez and Schon 2014). Isso se justifica devido à grande importância da mitocôndria na função celular. Apesar de pouco se saber sobre a influência do mtDNA na tumorigênese, diversos trabalhos vem associando variações no número de cópias de mtDNA em diversos tipos de tumores quando comparados com o tecido saudável vizinho e diversos aspectos clínicos e laboratoriais das doenças (Tabela 8) (Mi et al. 2015b).

Tabela 8 Variação do número de cópias de DNA mitocondrial em diversos tipos de tumores.

Origem do tumor	Número de cópias de mtDNA	Referência
Gástrico	Diminuição	Wu et al. 2005
Próstata	Diminuição	Tu et al. 2015
Mama	Diminuição	Fan et al. 2009
Hepático	Diminuição	Lee et al. 2004
Cabeça e pescoço	Aumento	Kim et al. 2004
Renal	Aumento	Elsayed et al. 2017
Ovário	Aumento	Mi et al.; Cormio et al. 2015
Linfoide	Aumento	Jain et al. 2018

Uma diminuição do número de cópias em pacientes com câncer gástrico foi correlacionada com processo ulcerativo e conseqüente uma pior sobrevida (Wu et al. 2005). Assim como no câncer de mama, que apresentou um maior grau histopatológico, menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença (Fan et al. 2009). Alguns trabalhos justificam essa diminuição de mtDNA com a perda

de função da POLGA juntamente com o TFAM em células tumorais, com consequente aumento de espécies reativas, por uma diminuição geral da função mitocondrial, criando assim um ambiente favorável para aquisições de mutações (Lee et al. 2015). Similarmente mutações na região do D-loop geram alterações de afinidade com os fatores de iniciação da replicação mitocondrial, que repercute em uma depleção do mtDNA acompanhada de uma deficiência respiratória celular e aumento da produção de ROS, como foi observado em pacientes com hepatocarcinoma (Lee et al. 2004).

Entretanto, nos cânceres de cabeça e pescoço, um aumento do número de cópias foi correlacionado com estágios mais avançados do tumor (Kim et al. 2004). No câncer de ovário, pacientes com alto grau de agressividade foi observado maior conteúdo de mtDNA do que em pacientes com baixo grau de agressividade (Cormio et al. 2015; Mi et al. 2015a). O principal fator que supostamente modula o aumento do número de cópias são defeitos na cadeia respiratória que resultam em um incremento na produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres na mitocôndria, atuando como um mecanismo de feedback na tentativa de compensar essa deficiência (Figura 8) (Dakubo 2010). Dessa forma, esse ambiente altamente reativo faz com que ocorram danos ao material genético mitocondrial que responde aumentando cada vez mais sua replicação. Entretanto, detalhes desses mecanismos permanecem pouco esclarecidos (Malik and Czajka 2013).

Alguns estudos corroboram esses achados, em que a indução de ROS por agentes como homocisteína e peróxido de hidrogênio em linhagens celulares acarretou no aumento no número de cópias e/ou biogênese mitocondrial. Esse fato é proveniente da elevação da expressão TFAM, Twinkle ou do Fator

respiratório nuclear 1 NRF1, que quando superexpressados, mostrou-se como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo in vitro (Perez-De-Arce et al. 2005; Thomas et al. 2011; Ikeda et al. 2015).

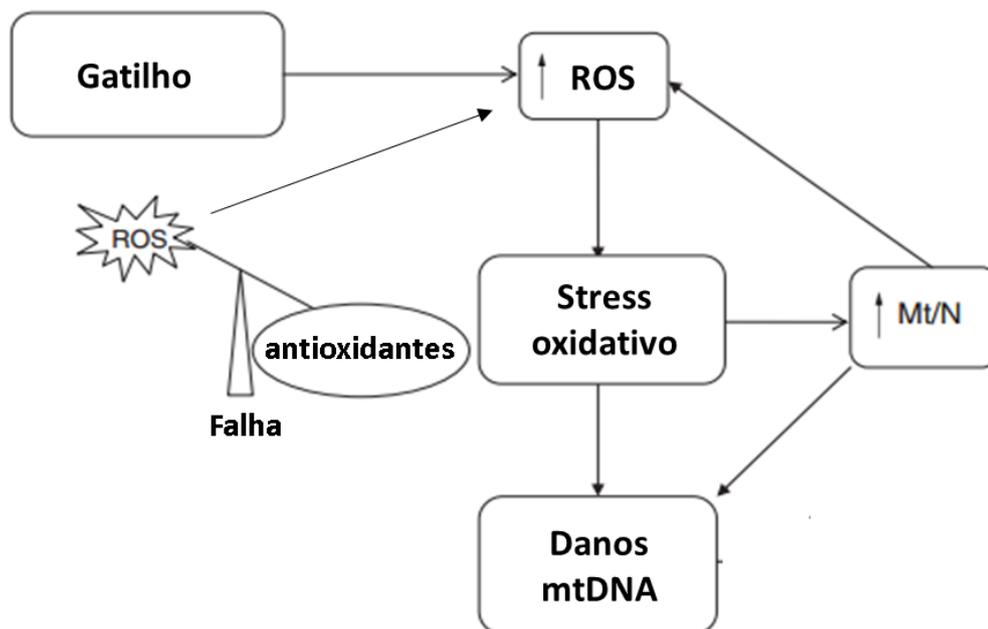


Figura 8. Hipótese do aumento do conteúdo mtDNA por aumento de ROS. A partir de um gatilho leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio intracelular que em condições normais a resposta antioxidante celular sequestra esses radicais. No entanto, sob condições crônicas ou disfunção mitocondrial, leva ao aumento da biogênese mitocondrial como resposta adaptativa, que pode ser observada pela elevação de mtDNA. Com o tempo o estresse oxidativo causa danos na mitocôndria e em seu material que vai gerar uma disfunção mais acentuada e danos mais severos a célula. Com isso, o mtDNA precede a disfunção mitocondrial. **Fonte:** modificado de Malik and Czajka 2013

Assim, apesar da literatura demonstrar a associação da variação do número de mtDNA em diversos tipos de câncer, pouco vem sendo estudada a sua associação no contexto oncohematológico. Dentre os estudos apresentados, predomina-se o envolvimento do número de cópias nas doenças de origem linfóides/linfomas, mostrando-se como um potencial biomarcador associado ao início e evolução da carcinogênese, bem como, na estratificação prognóstica dos pacientes com neoplasias hematológicas de origem mielóides (Jain et al. 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O estudo é do tipo coorte transversal com comparação interna e externa de grupos, realizado pelo Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial do Laboratório Central do Centro de Biociências as (NHCL LabCEN/CB/UFPE) e na Unidade de Hematologia Clínica e Laboratórios Especializados da Fundação HEMOPE (UNILABE). Amostras consecutivas de pacientes adultos com neoplasias hematológicas de origem mieloide (agudas e crônicas), diagnosticados e tratados no Hospital da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Recife/PE, seguindo os critérios de classificação, diagnósticos e tratamento preconizados pela OMS (Vardiman et al, 2009). Foram incluídos 267 pacientes portadores de LMA *de novo* não LPA, 147 pacientes com LPA e 233 pacientes com diagnóstico de NMPs Ph-negativo diagnosticados no período de agosto de 2003 a abril de 2018.

Como critérios de exclusão para os pacientes com LMA *de novo* os critérios de exclusão empregados foram: ausência de dados para diagnóstico de LMA (segundo critérios preconizados pela OMS), casos de LMA secundária a neoplasia mieloproliferativa/mielodisplásica/tratamento ou ainda indisponibilidade ao acesso dos prontuários dos pacientes. Já para os pacientes com NMP, empregamos a presença do rearranjo *BCR/ABL1* ou cromossomo philadelphia (Ph) (segundo critérios preconizados pela OMS apresentados previamente durante a revisão bibliográfica) ou ainda a indisponibilidade ao acesso dos prontuários dos pacientes.

As variáveis analisadas ao diagnóstico foram: idade, sexo, subtipos de classificação, dados do hemograma (contagem de leucócitos e plaquetas, e níveis

de hemoglobina e hematócrito) e dados moleculares com base nos critérios supracitados da OMS. O material utilizado na pesquisa (medula óssea) foi o mesmo encaminhado aos laboratórios de rotina para fins diagnósticos, e não foi feita nenhuma coleta adicional nos pacientes. O presente trabalho teve sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (Nº do parecer: 77527717.4.4.0000.5208) (Anexo I). A fundação de Hematologia de Pernambuco (HEMOPE), foi incluída no presente trabalho como instituição co-participante, uma vez que os pacientes foram atendidos na mesma. Os pacientes, após entrevista, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II), previamente aprovado pelo CEP.

A título de comparação, foram incluídas amostras de sangue periférico de 293 indivíduos saudáveis de ambos os sexos, com idade mediana de 42 anos (variando de 18 a 60 anos). Considerando como critérios de exclusão indivíduos obesos, fumantes, portadores de síndromes metabólicas (hipertensão e diabetes *mellitus*) e com histórico prévio de outras neoplasias ou doenças hematológicas de curso benigno. Sendo recrutados do serviço de doação de sangue e produção de hemocomponentes da Fundação HEMOPE, após entrevista prévia, leitura e assinatura do TCLE.

3.2 ANÁLISE MOLECULAR

3.2.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo a técnica de extração com base no fenol-clorofórmio (Davis et al 1986). Resumidamente, 5ml de amostra proveniente de MO dos pacientes ou SP dos indivíduos saudáveis foram submetidas a lise dos eritrócitos com auxílio de uma solução hipotônica (Cloreto de amônio 0,144M e Bicarbonato de amônio 0,01M), seguido de centrifugação a

1.200rpm por 10 min. Após o descarte do sobrenadante, uma solução de lavagem (TKM1, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 10µl de Triton X-100. Após homogeneização e centrifugação a 1.200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, um precipitado de leucócitos. A este precipitado foi adicionado 400µL da solução de lise de leucócitos (TKM2, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25µL de SDS 10% e incubado à 55 °C durante 45 minutos. Após esse período, 180µL de NaCl 5M foram adicionados e a solução mantida a temperatura ambiente por 15 minutos.

Em seguida, esse material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante recuperado e transferido para um novo microtubo. Em seguida, foi adicionando 400µL de fenol tamponado e 400µL de uma solução SEVAG, composta de 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico, seguido de homogeneização e centrifugação a 14.000rpm por 5 minutos. Mais uma vez o SEVAG foi misturado ao sobrenadante para última separação, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Neste novo microtubo, foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,2 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, EUA) e a análise de integridade realizada em gel de agarose 1%.

3.2.2 Quantificação relativa do número de cópias do mtDNA

A quantificação do número de cópias do mtDNA das amostras estudadas foram realizadas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), através da química SYBR®Green PowerUp MasterMix (Applied Biosystems®, EUA) como repórter da amplificação e recorrendo ao aparelho Aria MX® Real Time PCR System (Agilent Technologies®,EUA) em placas de 96 poços para as análises. Com o auxílio de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 9) para uma região específica do mtDNA, MT-CYT B, que codifica o citocromo B mitocondrial, normalizando os dados a partir da amplificação de um gene de cópia única no DNA nuclear, gene da piruvato quinase 1 (PK1).

Tabela 9. Sequência dos primers e tamanho esperado dos respectivos *amplicons*

Genes	Sequência do primers (5' → 3')	Tamanho esperado do produto de PCR
<i>CytB</i>		
<i>Forward:</i>	CACGATTCTTTACCTTTCACTTCATC	89bp
<i>Reverse</i>	TGATCCCGTTTCGTGCAAG	
<i>PK1</i>		
<i>Foward:</i>	AGCCCAAATGGCCTTGAA	84bp
<i>Reverse</i>	AGAGACAGAATGCCAGTGAGC	

Todas as reações foram realizadas em duplicata com um mix contendo um volume final de 20µL, contendo 1uL de amostra (20µg), 10uL *Sybrgreen* (2x), 1uL(0.25µM) de cada par de primer *forward* e *reverse*, e 7µL de H₂O. Além disso, foram incluídas amostras controles sem adição de DNA (*no template control*) e amostras referências, para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Assim como, ao final de cada reação foi realizada a curva de melting para exclusão de amplificação inespecífica. Na tabela 10, encontram-se as condições de reação do estudo.

Tabela 10. Configuração das condições de reação para determinação do número relativo de cópias de mtDNA

Etapa 1:	1 ciclo de UDG: 50°C por 2min. Tratamento com UDG para destruição de fragmentos de DNA.
Etapa 2	1 ciclo de <i>Hotstart</i> : 95°C por 10min. Ativação da <i>Taq</i> polimerase
Etapa 3	45 ciclos de: 95°C por 15s 60°C por 1min com aquisição de fluorescência.
Etapa 4	Análise da curva de <i>Melting</i> seguindo as recomendações do fabricante.

Após a amplificação do gene mitocondrial *CYTB* e do gene de cópia única do DNA nuclear (referência) *PK1*, foi feita uma triagem dos valores aberrantes ou atípicos, inconsistentes com as reações. Para tanto, amostras com resultados de *cycle threshold* (Ct) do gene de referência *PK1* que estavam acima ou abaixo de ± 2 desvios-padrão, foram excluídos do estudo. A quantificação relativa de mtDNA foi realizada pelo método comparativo do ΔCt , calculando-se a razão dos Cts (ΔCt mtDNA/ ΔCt nDNA) para cada amostra incluída no estudo. Os resultados foram expressos por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ dos pacientes – ΔCt do DNA de referência. Em que, foi utilizado um indivíduo de idade mediana representativo da coorte indivíduos saudáveis.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS, CATEGORIZAÇÃO DOS GRUPOS E DESFECHO CLÍNICO

Dado diferenças clínicas e biológicas das neoplasias hematológicas de origem mielóide, análises comparativas entre pacientes com baixo e alto conteúdo de mtDNA foram realizados em separado para pacientes com LMA de novo, LPA e NMP cromossomo Ph-negativo. A estratégia de estratificação dos pacientes levou em consideração a sobrevida global (SG) como desfecho principal. Os pacientes foram categorizados inicialmente em quartis e, de acordo com a

probabilidade de SG, aqueles que apresentaram probabilidades semelhantes seriam agrupados. Seguindo essa estratégia, pacientes com LMA *de novo* com alto conteúdo de mtDNA (pertencentes ao 4º quartil) apresentaram um seguimento de SG completamente distinto daqueles com baixo conteúdo de mtDNA (pertencentes ao 1º quartil). Contudo, não foi possível visualizar uma separação clara entre aqueles que apresentaram um conteúdo de mtDNA intermediário (pertencentes ao 2º e 3º quartil). Assim, estes pacientes com LMA *de novo* foram reclassificados em três grupos mediante semelhanças na curva de sobrevida e ao conteúdo de mtDNA: pacientes alocados no 1º quartil foram classificados como baixo conteúdo de mtDNA (69 pacientes), pacientes alocados no 2º e 3º quartil como intermediário conteúdo de mtDNA (135 pacientes) e pacientes no 4º quartil como alto conteúdo de mtDNA (63 pacientes). A mesma estratégia de categorização foi realizada para estratificar os pacientes com LPA: pacientes alocados no 1º e 2º quartis apresentaram probabilidades de SG semelhantes (baixo conteúdo de mtDNA, 74 pacientes), e que foi completamente distintas daqueles alocados no 3º e 4º quartis (alto conteúdo de mtDNA, 73 pacientes), sendo então, agrupados para análises posteriores. Pacientes com NMP cromossomo Ph-negativo não apresentaram uma distinção clara na SG entre os grupos. Assim, foram arbitrariamente categorizados de acordo com a mediana. Assim, após essa categorização com objetivo de aumentar o poder de análises estatísticas das variáveis clínicas e laboratoriais. O teste exato de Fisher ou Chi-quadrado (quando aplicável) foram empregados para comparar as diferenças entre as variáveis categóricas e o teste de Mann-Whitney para comparar variáveis contínuas.

As probabilidades estimadas para SG, sobrevida livre de doença (SLD) e remissão hematológica completa (RC) foram calculados usando o método Kaplan-Meier e o teste long-rank foi utilizado para comparar as diferenças entre as curvas nos pacientes com LMA *de novo* e o subtipo LPA. SG refere-se ao tempo compreendido entre o diagnóstico e o óbito/censura. SLD é o tempo entre a remissão completa e o primeiro evento: recaída ou óbito. RC foi definida como aspirados de medula óssea normocelulares, contendo menos de 5% de blastos leucêmicos e com evidências de maturação normal dos outros elementos, bem como a não visualização de blastos leucêmicos circulantes ou evidência de leucemia extramedular. Recaída foi definida como a presença de 5% ou mais de blastos na medula óssea, presença de blastos leucêmicos circulantes no sangue periférico, ou o desenvolvimento de leucemia extramedular. O teste log-rank foi utilizado para comparações das curvas de Kaplan-Meier. Para a análise multivariada, um modelo de risco proporcional de Cox foi utilizado para a SG e SLD. Todas as análises foram consideradas significativas quando os valores de P foram menores do que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE MTDNA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM LMA DE NOVO.

A Figura 9 mostra a quantificação relativa do número de cópias de mtDNA em pacientes com LMA *de novo* e indivíduos saudáveis. A título de comparação interna de grupos, os pacientes com LMA foram subclassificados de acordo com alterações genéticas apresentadas ao diagnóstico. Esta classificação incluiu pacientes com *core-binding fator-leukemia* (CBF-leukemia, 30 pacientes), pacientes com cariótipo normal (LMA-CN, 64 pacientes), pacientes com cariótipo complexo (21 pacientes) e pacientes cuja as alterações genéticas são menos recorrentes. Desta forma, estes pacientes foram agrupados como LMA-não classificadas (152 pacientes). De maneira geral, o número relativo de cópias de mtDNA foi significativamente maior nas amostras de LMA (valor mediano de mtDNA: 1,26, variação: 0,05 a 57,7) quando comparado aos indivíduos saudáveis (valor mediano: 0,67, variação: 0,1 a 3,4) ($P < 0,001$). Não houve diferenças do conteúdo de mtDNA entre os subtipos de LMA ($P > 0,05$) (Figura 1).

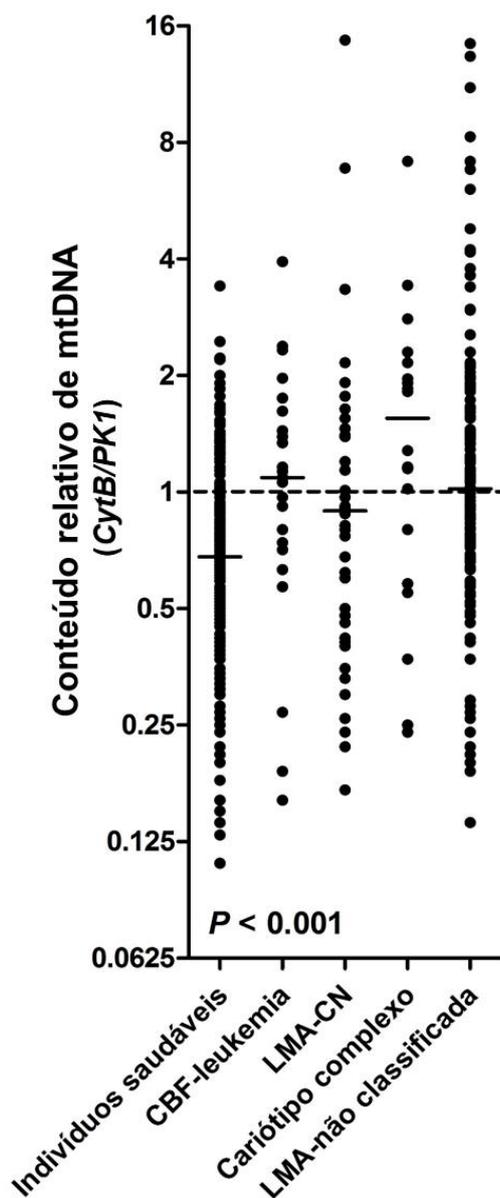


Figura 9. Distribuição do número relativo de cópias de mtDNA em pacientes com LMA de novo e indivíduos saudáveis. O número relativo de cópias foi significativamente maior entre o grupo LMA *de novo* frente aos indivíduos saudáveis. Entretanto, quando comparados entre si não houve diferença significativa. A barra horizontal representa o valor mediano de mtDNA. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns.

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMA de novo estão resumidas na Tabela 11. Pacientes com baixo conteúdo de mtDNA apresentaram uma mediana de idade significativamente menor do que pacientes com conteúdo de mtDNA intermediário e alto ($P = 0,029$). As demais variáveis analisadas foram semelhantes entre os grupos.

Tabela 11. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMA de acordo com o número relativo de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA).

Variáveis	Todos pacientes (n=267)		Nº de cópias DNA mitocondrial						P-valor
			Baixo (n=69)		Intermediário (n=135)		Alto (n=63)		
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
Sexo									0,962
Masculino	120	44,9	32	46,4	60	44,4	28	44,4	
Feminino	147	55,1	37	53,6	75	55,6	35	55,6	
Idade (anos), mediana (Intervalo)	49,9 18-93,7		43,1 18-83,3		53,3 18,1-90,8		50,1 19,1-93,7		0,029*
Classificação FAB									0,511
M0	13	6,9	6	10,2	7	6,7	-	-	
M1	31	16,4	7	11,9	17	16,3	7	26,9	
M2	62	32,8	17	28,8	38	36,5	7	26,9	
M4	60	31,7	20	33,9	32	30,8	8	30,8	
M5	17	9	6	10,2	9	8,7	2	7,7	
M6	4	2,1	2	3,4	1	1	1	3,8	
M7	2	1,1	1	1,7	-	-	1	3,8	
Sem classificação	78	-	10	-	31	-	37	-	
Alterações citogenéticas									0,266
Cariótipo normal	64	33	22	40,7	29	33	13	25	
t(8;21)(q22;q22)	17	8,8	4	7,4	10	11,4	3	5,8	
inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22)	13	6,7	3	5,6	6	6,8	4	7,7	
Monossomia 7	2	1	1	1,9	-	-	1	1,9	
Trissomia 8	3	1,5	-	-	3	3,4	-	-	
Cariótipo Complexo	21	10,8	6	11,1	11	8,1	4	7,7	
Outros	20	10,3	6	11,1	10	7,4	4	7,7	
Sem metáfase	54	27,8	12	22,2	19	14,1	23	44,2	
Não realizado	73	-	15	21,7	47	-	11	-	
Estratificação de risco MRC									0,450
Favorável	24	23,3	7	17,5	15	11,1	2	22,2	
Intermediário	60	58,3	24	60	32	23,7	4	44,4	
Adverso	19	18,4	9	22,5	7	5,2	3	33,3	
Não realizado	164	-	29	-	81	-	54	-	
NPM1/FLT3									0,8
Baixo risco	36	15,6	9	14,1	21	17,1	6	13,6	
Alto risco	195	84,4	55	85,9	102	82,9	38	86,4	
Faltante	36	-	5	-	12	-	19	-	
WBC ($\times 10^9/L$), mediana (Intervalo)	36500 490-435940		33895 1200-242500		40300 490-435940		35985 1120-259370		0,954
Contagem de Blasto MO (Intervalo)	69,5 3,1-76		67 20-97		66 10-100		75 0-99		0,17
Hemoglobina (g/dL), mediana (Intervalo)	8,15 3,1-76		8,55 4,2-13,5		8 3,1-76		8,1 4,7-12,3		0,332
PLT ($\times 10^9/L$), mediana (Intervalo)	48000 235-40400		42500 7000-404000		49000 235-402000		57000 7000-173000		0,352
LDH (U/L), mediana (Intervalo)	716,5 119-5390		624 129-4192		822 129-5289		703 119-5390		0,222

Abreviações:

LMA: leucemia mielóide aguda; FAB: Franco-Americana-Britânica; WBC: glóbulos brancos; PLT: plaquetas; MRC: *Medical Research Council*; MO: Medula óssea; LDH: lactato desidrogenase; LMA: Leucemia mielóide aguda.

Teste Qui-quadrado para variáveis categóricas

Teste Kruskal-Wallis para variáveis contínuas

* P-valor menor do que 5%.

Dos 267 indivíduos incluídos no estudo, 62 pacientes perderam seguimento antes da avaliação do *status* de remissão hematológica completa (RC) e, portanto, não foram incluídos nas análises de indução. No geral, 108/205 (52%) pacientes alcançaram RC. A taxa de remissão foi semelhante entre pacientes com baixo (46%), intermediário (47%) e alto conteúdo de mtDNA (53%) ($P = 0,692$). Dos 97 pacientes (48%) que não conseguiram alcançar a RC, 47 (48%) morreram dentro de 30 dias após o diagnóstico (mortalidade precoce). Embora os pacientes com alto conteúdo de mtDNA tenham uma menor taxa de mortalidade precoce (20%) em comparação àqueles com baixo (51%) e intermediário conteúdo de mtDNA (44%), essa diferença não foi significativa ($P = 0,057$).

A mediana de seguimento foi de 140 dias (intervalo: 1 a 3.244 dias), com SG estimada em 3 anos de 27% (intervalo de confiança de 95%, IC: 21 a 34%). O conteúdo de mtDNA não teve impacto na SG ($P = 0,543$) (Figura 10A). Dos 108 pacientes que atingiram a RC, 52 pacientes (48%) recidivaram em um tempo médio de 40 dias (intervalo: 1 a 389 dias). A taxa de SLD estimada em 3 anos foi de 31% (IC95%: 20-42%) e a incidência cumulativa de recaída (ICR) foi de 66% (95% IC: 55-77%). Pacientes com maior conteúdo de mtDNA tiveram SLD significativamente menor (168 dias, 95% CI: 129-206 dias) em comparação com pacientes com conteúdo de mtDNA intermediário (355 dias, 95% CI: 167-542 dias) e baixo (668 dias, 95 % IC: 0-1,372 dias) ($P = 0,019$) (Figura 10B). Análise de risco proporcional de Cox mostrou que o conteúdo de mtDNA foi significativamente associado com uma baixa taxa de SLD (*hazard ratio*, HR: 1,77, 95% CI: 1,2-2,6, $P = 0,004$), embora esta diferença não tenha se mantido após o ajuste com as variáveis de confundimento: idade, estratificação de risco citogenético e contagem de leucócitos (HR: 1,44; IC 95%: 0,69-2,98; $P = 0,326$).

Corroborando esses achados, pacientes com maior conteúdo de mtDNA tiveram uma maior ICR (28%, 95% CI: 7-49%) do que pacientes intermediários (12%, 95% CI: 3-21%) e baixo conteúdo de mtDNA (11% IC 95%: 1-22) ($P = 0,01$) (Figura 10C).

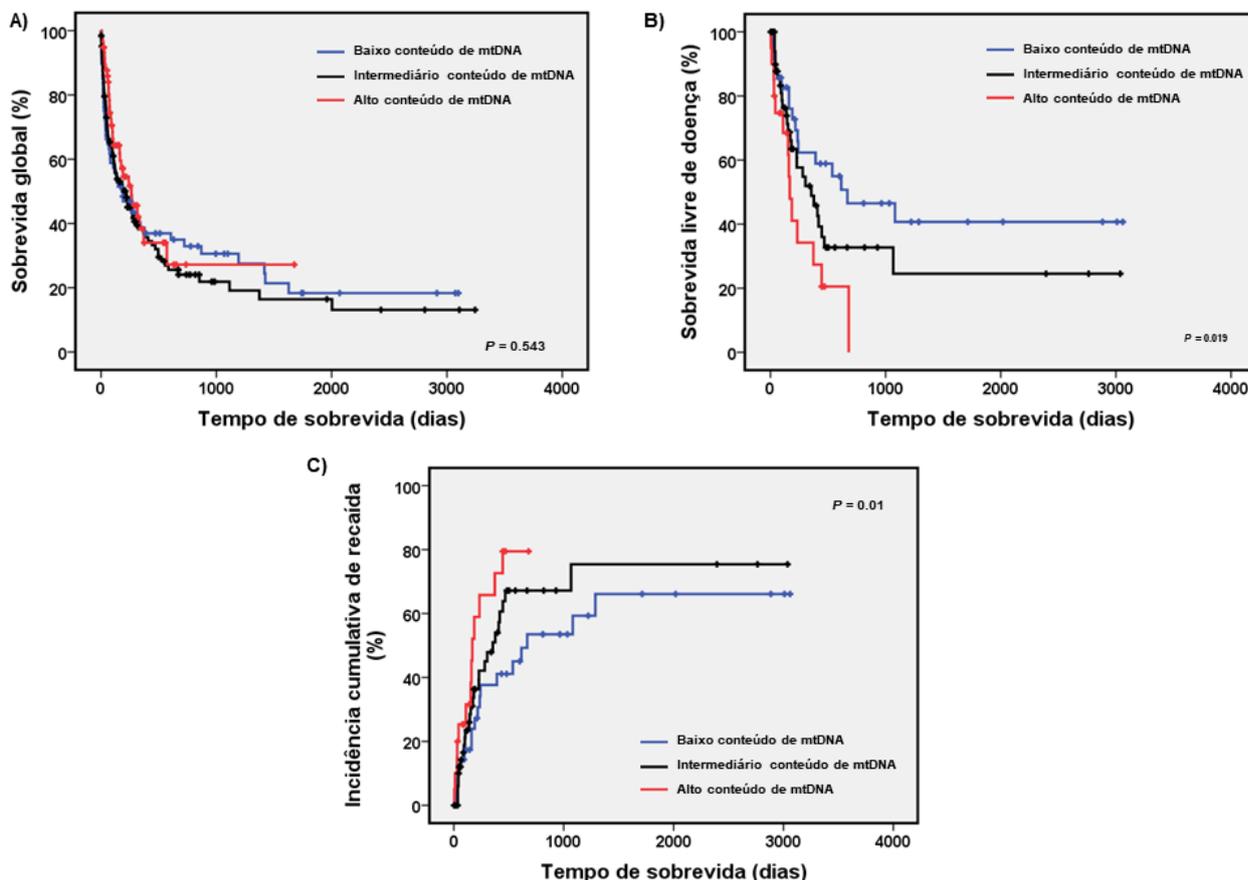


Figura 10: Evolução clínica nos pacientes com Leucemia mieloide aguda *de novo*. A) Sobrevida global de acordo com o número relativo de mtDNA. B) Sobrevida livre de doença de acordo com o número relativo de cópias de mtDNA. C) Índice cumulativo de recaída. As barras verticais representam pacientes cujos dados: A) foram censurados do diagnóstico até última vez em que se sabia que estavam vivos, B) cujos dados foram censurados no momento da remissão até última vez em que se sabia que estavam vivos, e C) foi determinada considerando morte com recaída como um risco competitivo. O tempo mediano de segmento foi apresentado em dias. Método Kaplan-Meier e o teste long-rank foi utilizado para comparar as diferenças entre as curvas.

4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE MTDNA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM LPA

A Figura 11 mostra a quantificação do número relativo de cópias de mtDNA em pacientes LPA e indivíduos saudáveis. A título de comparação interna de grupos, foram incluídos pacientes com *core-binding factor-leukemia* (CBF-leukemia, 30 pacientes), pacientes com cariótipo normal (LMA-CN, 64 pacientes), pacientes com cariótipo complexo (21 pacientes) e pacientes cuja as alterações genéticas são menos recorrentes e não classificadas. De maneira geral, o número relativo de cópias de mtDNA foi significativamente maior nas amostras de LPA (valor mediano de mtDNA: 1,43, variação: 0,13 a 38,6) quando comparado aos indivíduos saudáveis (valor mediano: 0,67, variação: 0,1 a 3,4), e aos outros subtipos de LMA *de novo* ($P < 0,001$) (Figura 11).

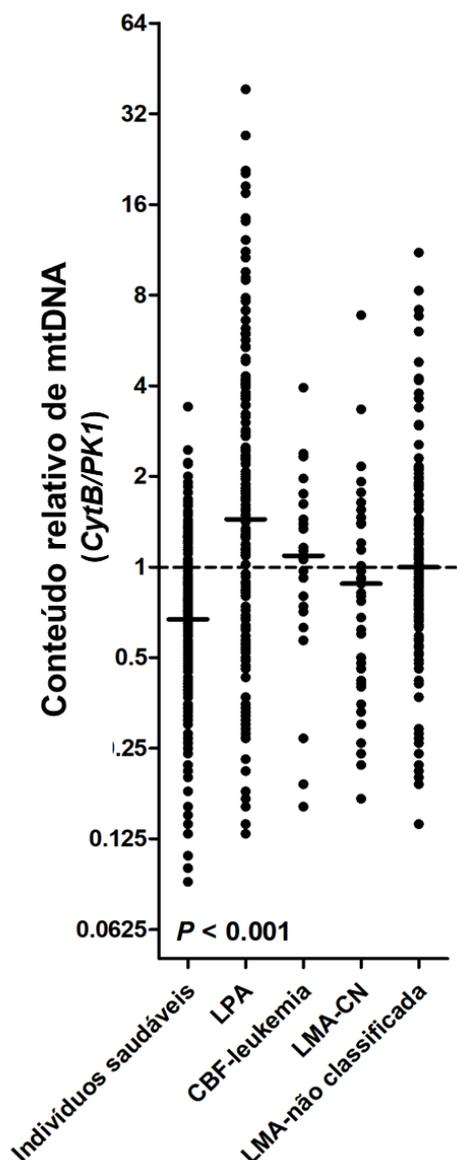


Figura 11. Distribuição do número relativo de cópias de mtDNA em pacientes com LPA. O número relativo de cópias foi significativamente maior entre o grupo LPA frente aos indivíduos saudáveis e os subtipos de LMA *de novo*. A barra horizontal representa o valor mediano de mtDNA. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns.

Quando analisado o número relativo de cópias de mtDNA dos pacientes LPA com baixo e alto conteúdo de mtDNA frente as variáveis clínicas e laboratoriais, não houve diferença significativa com nenhuma variável (Tabela 12).

Tabela 12. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LPA de acordo com o número relativo de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA).

Variáveis	Nº relativo de cópias DNA mitocondrial						P-valor
	Todos pacientes (n=147)		Baixo (n=74)		Alto (n=73)		
	No.	%	No.	%	No.	%	
Sexo	0,187						0,187
Feminino	79	53,7	44	59,5	35	47,9	
Masculino	68	46,3	30	40,5	38	52,1	
Idade (anos), mediana (Intervalo)	34,6 9,3-82,5		35,7 19,38-82,52		34,5 9,3-66,5		0,272
Idade categórica							0,067
<18 anos	9	6,1	1	1,4	8	11	
18-39 anos	80	54,4	41	55,4	39	53,4	
40-60 anos	48	32,7	25	33,8	23	31,5	
>60anos	10	6,8	7	9,5	3	4,1	
Subtipo morfológico							1
Hipergranular (FAB M3)	138	95,2	69	95,8	69	94,5	
Hipogranular (FAB M3 variante)	7	4,8	3	4,2	4	5,5	
Inclassificável	2	-	2	-	-	-	
Ponto de quebra do <i>PML</i>							0,36
BCR1	66	61,7	23	53,5	43	67,2	
BCR2	2	1,9	1	2,3	1	1,6	
BCR3	39	36,4	19	44,2	20	31,3	
Inclassificável	40	-	31	-	9	-	
Status ECOG							0,269
0	76	56,7	33	54,1	43	58,9	
1	28	20,9	16	26,2	12	16,4	
2	16	11,9	4	6,6	12	16,4	
≥3	14	10,5	8	13,1	6	8,2	
Desconhecido	13	-	13	-	-	-	
Risco de recaída							0,813
Baixo	24	16,3	12	16,2	12	16,4	
Intermediário	67	45,6	32	43,2	35	47,9	
Alto	56	38,1	30	40,5	26	35,6	
WBC (×10 ⁹ /L), mediana (Intervalo)	4020 0,8-132540		3660 1-126800		4460 0,8-132540		0,874
Hemoglobina (g/dL), mediana (Intervalo)	8,7 3,2-21,8		8,6 3,2-21,8		8,8 3,4-14,1		0,751
PLT (×10 ⁹ /L), mediana (Intervalo)	25000 7-157000		19000 7-157000		28000 8-128000		0,075
Creatinina (mg/dL) (intervalo)	0,8 0,4-4,3		0,8 0,4-4,3		0,8 0,42-1,88		0,217
Ácido Úrico (mg/dL), mediana (Intervalo)	3,9 0,8-10,3		4,1 1,1-10,3		3,9 0,8-8		0,473
Fibrinogênio (mg/dL) (Intervalo)	153 0-898		148 0-898		155,1 10-605		0,271
Albumina (mg/dL) (Intervalo)	3,9 2,2-5,4		3,9 2,4-5,4		3,9 2,2-5		0,52

Abreviações:

M3: leucemia promielocítica aguda; FAB: Franco-Americana-Britânica; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; WBC: glóbulos brancos; PLT: plaquetas; LDH: lactato desidrogenase.

Teste Qui-quadrado para variáveis categóricas

Teste Mann Whitney para variáveis contínuas

* P-valor menor do que 5%.

Com um tempo mediano de seguimento de 32 meses (intervalo: 1 a 101 meses), a taxa estimada de SG em 5 anos foi de 79% (IC 95%: 72 a 84%). A taxa de SG entre pacientes com baixo (78%, IC 95%: 61 a 88%) e alto conteúdo de mtDNA (79%, IC 95%: 68 a 87%) foram semelhantes ($P=0.484$) (Figura 11A). 122 (83%) dos 147 pacientes incluídos no estudo alcançaram RC. Dos 25 pacientes (17%) que não obtiveram a RC, 18 (72%) apresentaram mortalidade precoce em até 30 dias após o diagnóstico. As principais causas de morte durante o tratamento foram hemorragia (10 pacientes, 56%), seguida de infecção (7 pacientes, 39%) e trombose do sistema nervoso central (1 paciente, 5%). O conteúdo de mtDNA não teve impacto sobre a RC ($P=0.518$) e mortalidade precoce ($P=0.326$).

Dos 122 pacientes que atingiram a RC, 19 pacientes (16%) recaíram em um tempo médio de 41 dias (intervalo: 18 a 389 dias). A taxa estimada de SLD em 5 anos na coorte foi de 87% (IC 95%: 80 a 92%) e a incidência cumulativa de recaída (ICR) foi de 12% (IC 95%: 7 a 17%). Pacientes com baixo número de cópias de mtDNA tiveram uma menor taxa de SLD (66%, IC 95%: 47 a 80%) em comparação com alto número de cópias de mtDNA (89%, IC 95%: 77 a 94%) ($P=0.024$) (Figura 11B). Análise de risco proporcional de Cox mostrou que o conteúdo de mtDNA foi significativamente associado com uma baixa taxa de SLD (*hazard ratio*, HR: 0,28, 95% CI: 0,1-0,74, $P = 0,009$), em que esta diferença se manteve após o ajuste com as variáveis de confundimento: idade, sexo e categoria de risco (HR: 0,27; IC 95%: 0,16-0,85; $P = 0,01$). Ademais, a ICR foi maior em pacientes com baixo número de cópias de mtDNA (33%, IC 95%: 17 a 50%) do que em pacientes com alto número de cópias (11%, IC 95%: 4 a 19%) ($P=0.02$) (Figura 11C).

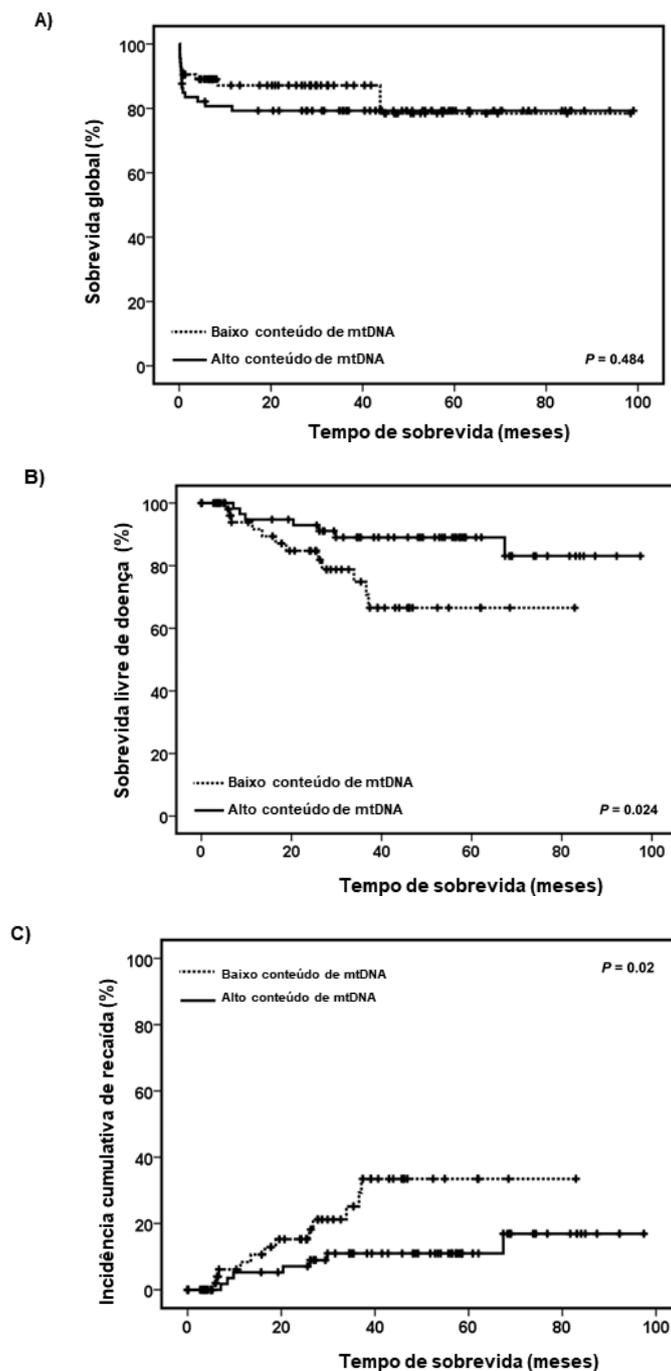


Figura 11. Evolução clínica nos pacientes com LPA de acordo com o número relativo de cópias de mtDNA. (A) Sobrevida global. (B) Sobrevida livre de doença. (C) Incidência cumulativa de recaída. Os pacientes foram estratificados pela mediana do conteúdo de mtDNA. As barras verticais representam pacientes cujos dados: A) foram censurados do diagnóstico até última vez em que se sabia que estavam vivos, B) cujos dados foram censurados no momento da remissão até última vez em que se sabia que estavam vivos, e C) foi determinada considerando morte com recaída como um risco competitivo. O tempo mediano de segmento foi apresentado em meses. Método Kaplan-Meier e o teste *long-rank* foi utilizado para comparar as diferenças entre as curvas.

4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE MTDNA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM NMPS PH-NEGATIVO.

Com base na distribuição do número relativo de cópias de mtDNA nas 233 amostras de pacientes com NMPs Ph-negativo e 293 indivíduos saudáveis (Figura 12). Os pacientes com PV ($P < 0,001$), TE ($P < 0,001$) e MFP ($P < 0,01$) apresentaram um menor conteúdo de mtDNA (mediana: 0,39; variação: 0,07 a 15,03) em relação aos indivíduos saudáveis. Entretanto quando analisados entre si não foram significativamente diferentes.

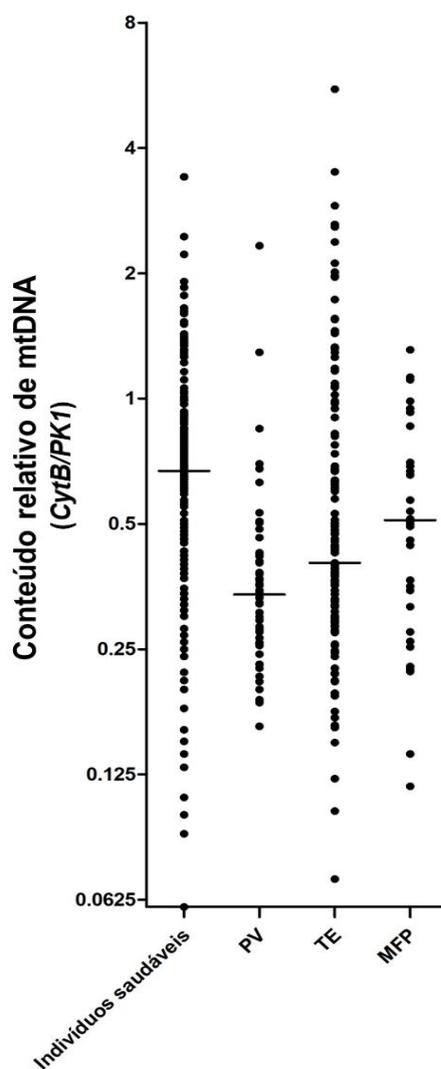


Figura 12. Distribuição do número relativo de cópias de mtDNA em pacientes com neoplasia mieloproliferativas crônicas Ph-negativas e indivíduos saudáveis. O conteúdo de mtDNA nos pacientes com Policitemia vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primaria (MFP) foram significativamente diferentes quando comparado aos indivíduos saudáveis. Entretanto

quando comparados entre se essa diferença não foi observada. A barra horizontal representa o valor mediano de mtDNA. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis,

Sumariamente, os pacientes foram analisados em conjunto, e aqueles que foram categorizados com alto número relativo de cópias de mtDNA foram relacionados com baixos níveis de hemoglobina ($P=0,001$) e hematócrito ($P=0,004$). Entretanto, para as demais características clínicas e laboratoriais como sintomas constitucionais ($P=0,472$), necessidade transfusional ($P=0,159$), trombose ($P=0,669$), hemorragia ($P=0,322$), contagem global de leucócitos ($P=0,538$) e níveis de LDH ($P=0,251$) não foram observadas diferenças significativas. Quando avaliados individualmente (PV, TE e MFP), os pacientes com PV (59 pacientes, 25,3%) não foram observadas diferenças significativas entre conteúdo de mtDNA frente as variáveis clínicas e laboratoriais. Entretanto, quando analisados nos pacientes com TE (141 pacientes, 60,5%) e pacientes com MFP (33 pacientes, 14,2%) que foram categorizados com altos números de cópias de mtDNA, houve uma maior frequência do sexo feminino ($P=0,028$) nas pacientes com TE e menor mediana de idade nos pacientes com MFP ($P=0,043$) (Tabela 13).

Tabela 13: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMPs Ph-negativos de acordo com o número relativo de cópias de mtDNA.

Características	Todos pacientes n =233				Policitemia vera n =59				Trombocitemia essencial n =141				Mielofibrose primária n =33			
	Baixo (n =116)		Alto (n =117)		Baixo (n =39)		Alto (n =20)		Baixo (n = 66)		Alto (n =75)		Baixo (n = 11)		Alto (n =22)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Sexo																
Mulher	84	72,4	73	62,4	23	59	11	55	54	81,8	49	65,3	7	63,6	13	59,1
Homem	32	27,6	44	37,6	16	41	9	45	12	18,2	26	34,7	4	36,4	9	40,9
Necessidade transfusional																
Não	106	91,4	100	85,5	38	97,4	18	90	62	93,9	69	92	6	54,5	13	59,1
Sim	10	8,6	17	14,5	1	2,6	2	10	4	6,1	9	8	5	45,5	9	40,9
Esplenomegalia																
Não	88	75,9	84	71,8	23	59	14	70	62	90,9	63	84	3	27,3	7	31,8
Sim	28	24,1	33	28,2	16	41	8	30	4	9,1	12	16	8	72,7	15	68,2
Trombose																
Não	106	90,4	105	89,7	35	89,7	17	85	60	90,9	69	92	11	100	19	86,4
Sim	10	8,6	12	10,3	4	10,3	3	15	6	9,1	6	8	-	-	3	13,6
Hemorragia																
Não	98	84,5	104	89,9	30	76,9	15	75	57	86,4	70	93,3	11	100	19	86,4
Sim	18	15,5	13	11,1	9	23,1	5	25	9	13	5	6,7	-	-	3	13,6
Sangria																
Não	79	68,1	103	88	7	17,9	8	40	63	95,5	74	98,7	9	81,8	21	95,5
Sim	37	31,9	14	12	32	82,1	12	60	3	4,5	1	1,3	12	18,2	1	4,5
Sintomas constitucionais																
Não	64	55,2	70	59,8	13	33,3	5	25	46	69,7	53	70,7	5	45,5	12	54,5
Sim	52	44,8	47	40,2	26	66,7	15	75	20	30,3	22	29,3	6	54,5	10	
JAK2 V617F																
Selvagem	44	37,9	52	44,4	4	10,3	2	10	37	56,1	39	52	3	27,3	5	50
Mutado	72	62,1	65	55,6	35	89,7	18	90	29	43,9	36	48	8	72,7	5	50
Gene CALR																
Selvagem	29	69	29	58	-	-	-	-	24	68,6	22	57,9	1	33,3	5	50
Mutado	13	31	21	42	-	-	-	-	11	31,4	16	42,1	2	66,7	5	50
Não aplicável	74	-	67	-	-	-	-	-	31	-	37	-	8	-	12	-
Gene MPL																
Selvagem	16	59,3	22	78,6	-	-	-	-	12	54,5	16	80	-	-	4	66,7
Mutado	11	40,7	6	21,4	-	-	-	-	10	45,5	4	20	1	100	2	33,3
Não aplicável	89	-	89	-	-	-	-	-	44	-	55	-	10	-	16	-
Tripla Negativo	16	14,3	21	18,6	4	10,3	2	10	12	19,4	16	22,2	-	-	3	14,3
Idade (anos), mediana	58,1		55,7		60,2		63,3		53,1		56,9		65		51,3	
Intervalo	10,9-95,1		14,7-84,2		21,6-86,2		25,5-800		10,9-86,7		14,7-82,4		42,7-95,1		25,4-84,2	
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	10,9		11		11,6		12		9,9		10,1		19,7		20,4	

Intervalo	2,1-56,2	2,6-54,3		3,7-24,6	4,2-22,8		2,1-56,2	4-48,1		3,8-50,7	2,6-54,3	
Hematócrito (%), mediana	44	40,9	0,001*	63,8	59,4	0,099	40	40,5	0,430	37	30,3	0,051
Intervalo	19,9-79	16,9-71,3		29,7-79	49,7-71,3		19,9-60,7	17,8-58,6		27,7-62,9	16,9-66,2	
Hemoglobina (g/dL), mediana	14	13,4	0,004*	20,5	19,4	0,206	13,1	13,2	0,577	11,4	8,9	0,131
Intervalo	5,8-26,7	5,2-22,9		9,9-26,7	15,1-22,9		5,8-19,9	5,2-19		8,5-14,4	5,3-19,9	
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	706	783	0,213	474,5	405	0,986	900	939	0,984	374	627,5	0,731
Intervalo	104-3263	26-2291		132-1440	185-866		439-3262	306-2291		104-2125	26-1825	
LDH (U/L), mediana	467,5	513,5	0,251	523	722	0,072	379,5	428,5	0,479	656	635	0,371
Intervalo	163-3690	200-2019		222-1127	553-984		163-908	200-1358		509-3690	252-2019	

Abreviações:

WBC: glóbulos brancos; PLT: plaquetas; LDH: lactato desidrogenase.

Teste Qui-quadrado para variáveis categóricas

Teste Mann-Whitney para variáveis contínuas

* P-valor menor do que 5%

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, nós investigamos o impacto clínico do número relativo de cópias do mtDNA em pacientes com neoplasias hematológicas de origem mieloide. Nossos resultados mostraram diferenças significativas no conteúdo de mtDNA de indivíduos saudáveis e pacientes. Além disso, o conteúdo de mtDNA encontra-se diferencialmente expresso entre os diferentes grupos de doenças mieloides (agudas e crônicas), com associações significativas (porém não completamente compreendidas) com a evolução clínica e desfecho dos pacientes.

No que diz respeito a comparação do conteúdo de mtDNA entre tecido neoplásico (neoplasias hematológicas) e tecido normal (indivíduos saudáveis), a literatura mundial mostra que este pode variar (para mais ou para menos) a depender do tipo de tumor (Mi et al. 2016), e esta variação pode estar associada com características clínicas do paciente. Foi relatado um aumento do número de cópias de mtDNA em câncer de cabeça e pescoço (Jiang et al. 2005), endométrio (Wang et al. 2005), mama (Shen et al. 2010) e próstata, cólon e ovário (Hofmann et al. 2014) quando pareados com seus respectivos controles. Em contrapartida, uma diminuição do número de cópias de mtDNA foi reportada em pacientes com astrocitoma (Correia et al. 2011), câncer gástrico e carcinoma hepatocelular (Vivekanandan et al. 2010). Em ambos os casos, o aumento ou diminuição do conteúdo de mtDNA foi significativamente associado com a evolução clínica (metástase) destes tumores. Na China, um maior conteúdo de mtDNA foi associado com pior sobrevida global e sobrevida livre de doença em 598 pacientes com câncer colorretal (Qu et al. 2015). Por outro lado, pacientes com carcinoma de células escamosas incluídos no grupo de menor número relativo de mtDNA apresentaram um pior desfecho clínico (menor sobrevida global e

sobrevida livre de doença) quando comparados com aqueles que foram incluídos no grupo de maior número relativo de mtDNA. Os autores ainda mostraram que a depleção *in vitro* do mtDNA em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas levou a uma maior tolerância a hipóxia e a características mais agressivas inerentes a células primárias (Masuike et al. 2018). Achados semelhantes foram observadas no câncer renal (Lin et al. 2016) e no câncer de mama (Guha et al. 2014), onde a depleção induzida do mtDNA conferia as células tumorais uma maior atividade de migração para outros sítios, aumentando assim o grau de metástase. De acordo com esses relatos, fica evidente que a mitocôndria exerce um papel fundamental, mas não completamente conhecido, na biologia do câncer e impactando na clínica (Tu et al. 2015a; Weerts et al. 2016; Elsayed et al. 2017; Masuike et al. 2018).

No que tange as neoplasias hematológicas, a comparação entre tecido neoplásico e tecido normal merece uma atenção especial. Doenças de caráter agudo (LMA e LPA) mostraram um aumento significativo do conteúdo de mtDNA em comparação com amostras de indivíduos saudáveis, enquanto que doenças de caráter crônico apresentaram uma diminuição significativa do mtDNA frente aos indivíduos saudáveis. No que diz respeito às doenças agudas, é importante levar em consideração com a comparação “neoplásico versus saudável” foi feita entre amostras de medula óssea (pacientes) e sangue periférico (indivíduos saudáveis), fato este que pode influenciar nossas conclusões. Uma forma de tentar corrigir esse viés de análise seria realizar uma coleta pareada de amostras de medula óssea e sangue periférico de indivíduos saudáveis a fim de responder se existe diferença no conteúdo de mtDNA entre amostras provenientes de diferentes sítios.

Limitações à parte, nossos resultados mostraram que o número relativo de mtDNA varia substancialmente entre pacientes com LMA e LPA, e essa variação encontra-se associada com um pior desfecho clínico. No grupo LMA *de novo*, nossos resultados corroboraram achados prévios descritos na literatura. Primeiramente em 1996, Boulwood e colaboradores demonstraram que blastos primários de LMA frequentemente apresentam um aumento consistente da massa mitocondrial em comparação com células progenitoras hematopoiéticas não malignas CD34-positivas (Boulwood et al. 1996). Como também observado em uma coorte de 55 pacientes pediátricos com leucemia mieloide aguda da Korea apresentaram um aumento da massa mitocondrial, bem como níveis elevados de mtDNA (Kang et al. 2016). Além disso, quando avaliadas as implicações clínicas e laboratoriais, foi demonstrado em uma coorte de 51 pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda da Índia que altos níveis de mtDNA foram associados com uma menor sobrevida livre de doença, quando comparados aos pacientes com os de baixos níveis (Jain et al. 2018).

O que nos chamou a atenção foi a incongruência dos resultados: pacientes com LMA alocados no grupo com maior número relativo de mtDNA apresentam uma menor sobrevida livre de doença por conta de uma maior taxa cumulativa de recaída, enquanto que o cenário correspondente (pior desfecho e evolução clínica) para LPA foi observado para aqueles pacientes alocados no grupo com menor número de cópias. Neste caso, é preciso levar em consideração características clínicas e biológicas da doença, bem como diferentes protocolos terapêuticos adotados na prática clínica (Kadia et al. 2015). A fisiopatologia de pacientes com LMA *de novo* é caracterizada por um acúmulo de células leucêmicas imaturas e indiferenciadas com taxa variada de proliferação celular, fazendo com que a base do tratamento seja o uso de agentes antracíclicos

(Carneiro et al. 2015). Já na LPA, blastos leucêmicos apresentam uma taxa reduzida de proliferação celular; contudo, estes são caracterizados por um bloqueio específico no estágio de promielócito (de Thé et al. 2017), fazendo com que agentes indutores de diferenciação (ácido *all-trans* retinóico, ATRA), associados com antracíclicos (quimioterápicos) ou indutores de apoptose (trióxido de arsênico, ATO), seja a opção de escolha para o tratamento para esses pacientes (Lo-Coco et al. 2013). Diante desta diversidade nos protocolos clínicos, é factível que a resposta da mitocôndria a diferentes agentes terapêuticos possa diferir em cada doença, levando a modulação metabólica distinta, principalmente no que diz respeito a diferenciação, replicação celular e indução da apoptose (Malik and Czajka 2013; Lee et al. 2016).

Dando suporte a esta hipótese, Liyanage e colaboradores demonstram em modelos de linhagens celulares representativas de LMA que a diminuição do conteúdo de mtDNA por meio de um inibidor seletivo de polimerase mitocondrial leva a uma diminuição da fosforilação oxidativa da mitocôndria com aumento seletivo da citotoxicidade celular, ou seja, melhor resposta ao agente indutor de apoptose. Utilizando um modelo de xenotransplante, os autores demonstraram ainda que inibição seletiva de kinases reguladoras da biogênese do mtDNA pode levar a uma regressão tumoral com baixos níveis de toxicidade para o animal (Liyanage et al. 2017). Resultados semelhantes foram observados em linhagens celulares de tumores sólidos, cujo o bloqueio de fatores relacionados com a replicação do mtDNA levou a um aumento na taxa de apoptose induzida por drogas. Mei e colaboradores demonstraram que o número reduzido de mtDNA aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio, tornando as células mais sensíveis a agentes quimioterápicos (Mei et al. 2015). Dessa forma, pode-se inferir que pacientes com um baixo conteúdo de mtDNA possam responder

melhor a protocolos terapêuticos e que a diminuição de mtDNA possa funcionar como um mecanismo de sensibilização de células tumorais.

Preliminarmente, nossos dados não permitem explicar as incongruências entre LMA e LPA. As análises de sobrevida mostraram que pacientes com LPA com baixo conteúdo de mtDNA ao diagnóstico apresentam uma pior resposta ao tratamento com ATRA e antracíclicos. Contudo, em um projeto paralelo utilizando um modelo de alotransplante para LPA, nosso grupo demonstrou que a quantidade relativa de mtDNA aumenta significativamente após a enxertia das células leucêmicas nos receptores murinos e diminui gradativamente após o início e continuidade do tratamento com ATRA, podendo chegar a níveis similares ou mesmo inferiores àqueles observados antes do transplante. Resultados semelhantes foram observados quando blastos primários de pacientes com LPA foram tratados *in vitro* com ATRA. Com uma análise pareada pré- e pós-tratamento será possível uma pesquisa de reguladores moleculares que atuem na biogênese do mtDNA. Assim, espera-se com a conclusão desta etapa do projeto explicações biológicas para a quantificação diferencial de mtDNA na LPA e como e por que esta variação influencia no tratamento dos pacientes.

Quanto aos pacientes com doença de curso clínico crônico (NMP cromossomo Ph-negativo) foi observado uma diminuição significativa do número de cópias de mtDNA em comparação a indivíduos saudáveis. Este achado pode estar associado a capacidade inerente de diferenciação terminal das células de NMP devido a ativação da via JAK/STAT (Staerk and Constantinescu 2012). É possível também que a ativação constitutiva dessa via não exerça efeito direto sobre os estímulos metabólicos e apoptóticos mitocondriais que dão suporte a proliferação e diferenciação celulares (Sun and St John 2016).

Alguns estudos tem investigado associações de marcadores moleculares com parâmetros clínicos e laboratoriais nos pacientes com NMP Ph-negativas, como exemplo a carga a alélica da mutação JAK2V617F. Em 2015, Yonalhindilerden e colaboradores demonstraram que pacientes quando estratificados de acordo com a carga alélica da JAK2V617F foi observado associações com pior prognóstico, níveis mais baixos de hemoglobina e hematócrito, níveis mais elevados de LDH, acentuada esplenomegalia e maior prevalência de eventos hemorrágicos. Estes achados corroboram com os encontrados em nosso estudo em que variações no conteúdo do mtDNA nos pacientes com PV, TE e MFP mostram-se associados com variáveis clínicas e laboratoriais, quando avaliados em conjunto ou individualmente.

Embora a ausência de ensaio funcionais e estudos da quantificação do mtDNA durante ou após a terapia de indução, nossos resultados mostraram-se fortemente associados ao prognóstico dos pacientes com neoplasias hematológicas. Assim, faz-se necessária investigações mais profundas do envolvimento do mtDNA nas neoplasias de origem mieloide, com o objetivo de compreender de forma mais detalhada as suas implicações na fisiopatologia para assim possibilitar em uma melhor estratificação dos pacientes, criando melhores estratégias terapêuticas adaptadas ao risco.

6 CONCLUSÕES

- O número relativo de cópias do mtDNA variou significativamente entre pacientes com neoplasias hematológicas de caráter agudo (para mais) e crônico (para menos) quando comparados com indivíduos saudáveis;
- O aumento do número relativo de mtDNA ao diagnóstico foi associado com uma pior evolução clínica de pacientes adultos com LMA *de novo*;
- A diminuição no número relativo de mtDNA ao diagnóstico foi associado com uma pior evolução clínica de pacientes com LPA;
- O aumento do número relativo de cópias de mtDNA nos pacientes com NMP cromossomo Ph-negativo foi associado com baixos níveis de hemoglobina e hematócrito, frequência no gênero feminino e menor mediana de idade, embora não tenha sido associado com evolução e desfecho clínico da doença.

REFERÊNCIAS

- Angona A, Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, Camacho L, Fernández-Rodríguez C, Pairet S, Longarón R, Ancochea Á, Senín A et al. (2015) **Hematopoietic clonal dominance, stem cell mutations, and evolutionary pattern of JAK2V617F allele burden in polycythemia vera.** *Eur J Haematol* 94:251–257. doi: 10.1111/ejh.12425
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, Cazzola M and Vardiman JW (2016) **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** *Blood* 127:2391–2406. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.The
- Area-Gomez E and Schon EA (2014) **Mitochondrial genetics and disease.** *J Child Neurol* 29:1208–1215. doi: 10.1177/0883073814539561
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N et al. (2005) **Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders.** *Lancet* 365:1054–1061. doi: 10.1016/S0140-6736(05)74230-6
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R et al. (2008) **MPL mutations in myeloproliferative disorders: Analysis of the PT-1 cohort.** *Blood* 112:141–149. doi: 10.1182/blood-2008-01-131664
- Carneiro B, Altman J, Kaplan J, Ossenkoppele G, Swords R, Plataniias L and Giles F (2015) **Targeted therapy of acute myeloid leukemia.** *Expert Rev Anticancer Ther* 15:1–15. doi: 10.1586/14737140.2015.1004316
- Chappel S (2013) **The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst.** *Obstet Gynecol Int* 2013:183024. doi: 10.1155/2013/183024
- Chen E and Mullally A (2011) **How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms ?** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 268–276.
- Chi J, Nicolaou K a, Nicolaidou V, Koumas L, Mitsidou A, Pierides C, Manoloukos M, Barbouti K, Melanthiou F, Prokopiou C et al. (2014) **Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis.** *Leukemia* 28:1152–1154. doi: 10.1038/leu.2013.382
- Clayton DA (1982) **Replication of animal mitochondrial DNA.** *Cell* 28:693–705. doi: 10.1016/0092-8674(82)90049-6
- Copeland WC and Longley MJ (2014) **Mitochondrial genome maintenance in health and disease.** *DNA Repair (Amst)* 19:190–198. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.010
- Cormio A, Cormio G, Musicco C, Sardanelli AM, Gasparre G and Gadaleta MN (2015) **Mitochondrial changes in endometrial carcinoma: Possible role in tumor diagnosis and prognosis (Review).** *Oncol Rep* 33:1011–1018. doi:

10.3892/or.2014.3690

Dakubo G (2010) **Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Handb Free Radicals Form Types Eff** 99–116. doi: 10.1186/2049-3002-2-17

Dash A and Gilliland DG (2001) **Molecular genetics of acute myeloid leukaemia.** Best Pract Res Clin Haematol 14:49–64. doi: 10.1053/beh.2000.0115

de Thé H, Pandolfi PP and Chen Z (2017) **Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure.** Cancer Cell 32:552–560. doi: 10.1016/j.ccell.2017.10.002

Defour JP, Chachoua I, Pecquet C and Constantinescu SN (2016) **Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: Implications for myeloproliferative neoplasms.** Leukemia 30:1214–1216. doi: 10.1038/leu.2015.271

Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS and Morton LM (2012) **Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007.** Blood 119:34–43. doi: 10.1182/blood-2011-04-347872

Elsayed ET, Hashad MM and Elgohary IE (2017) **Mitochondrial DNA copy number variation as a potential predictor of renal cell carcinoma.** Int J Biol Markers 32:e313–e318. doi: 10.5301/ijbm.5000268

Falkenberg M, Larsson N-G and Gustafsson CM (2007) **DNA replication and transcription in mammalian mitochondria.** Annu Rev Biochem 76:679–99. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028

Fan AX-C, Radpour R, Haghighi MM, Kohler C, Xia P, Hahn S, Holzgreve W and Zhong XY (2009) **Mitochondrial DNA content in paired normal and cancerous breast tissue samples from patients with breast cancer.** J Cancer Res Clin Oncol 135:983–989. doi: 10.1007/s00432-008-0533-9

Finazzi G, De Stefano V and Barbui T (2013) **Are MPNs vascular diseases?** Curr Hematol Malig Rep 8:307–316. doi: 10.1007/s11899-013-0176-z

Focosi D (2007) **Acute myeloid leukaemia.** Lancet 369:367. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60183-4

Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, Van Dyke D, Hanson C, Wu W, Pardanani A et al. (2011) **DIPSS plus: A refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status.** J Clin Oncol 29:392–397. doi: 10.1200/JCO.2010.32.2446

Geyer HL, Scherber RM, Dueck AC, Kiladjian JJ, Xiao Z, Slot S, Zweegman S, Sackmann F, Fuentes AK, Hernández-Maraver D et al. (2014) **Distinct clustering of symptomatic burden among myeloproliferative neoplasm patients: Retrospective assessment in 1470 patients.** Blood 123:3803–3810. doi: 10.1182/blood-2013-09-527903

- Gilliland DG (1998) **Molecular genetics of human leukemia**. *Leukemia* 12 Suppl 1:S7-12.
- Gilliland DG and Tallman MS (2002) **Focus on acute leukemias**. *Cancer Cell* 1:417–420. doi: 10.1016/S1535-6108(02)00081-8
- Grimwade D and Mrózek K (2011) **Diagnostic and Prognostic Value of Cytogenetics in Acute Myeloid Leukemia**. *Hematol Oncol Clin North Am* 25:1135–1161. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2011.09.018>
- Guha M, Srinivasan S, Ruthel G, Kashina AK, Carstens RP, Mendoza A, Khanna C, Van Winkle T and Avadhani NG (2014) **Mitochondrial retrograde signaling induces epithelial-mesenchymal transition and generates breast cancer stem cells**. *Oncogene* 33:5238–5250. doi: 10.1038/onc.2013.467
- Hanahan D and Weinberg RA (2000) **The hallmarks of cancer**. *Cell* 100:57–70. doi: 10.1007/s00262-010-0968-0
- Hengartner MO (2000) **The biochemistry of apoptosis**. *Nature* 407:770–6. doi: 10.1038/35037710
- Holt IJ, Lorimer HE and Jacobs HT (2000) **Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA**. *Cell* 100:515–524. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80688-1
- Ikeda M, Ide T, Fujino T, Arai S, Saku K, Kakino T, Tynismaa H, Yamasaki T, Yamada KI, Kang D et al. (2015) **Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress**. *PLoS One* 10:1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0119687
- Jain A, Bakhshi S, Thakkar H, Gerards M and Singh A (2018) **Elevated mitochondrial DNA copy numbers in pediatric acute lymphoblastic leukemia: A potential biomarker for predicting inferior survival**. *Pediatr Blood Cancer* 65:1–7. doi: 10.1002/pbc.26874
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A et al. (2005) **A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera**. *Nature* 434:1144–1148. doi: 10.1038/nature03546
- Kadia TM, Ravandi F, O'Brien S, Cortes J and Kantarjian HM (2015) **Progress in acute myeloid leukemia**. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 15:139–151. doi: 10.1016/j.clml.2014.08.006
- Kang MG, Kim YN, Lee JH, Szardenings M, Baek HJ, Kook H, Kim HR and Shin MG (2016) **Clinicopathological implications of mitochondrial genome alterations in pediatric acute myeloid leukemia**. *Ann Lab Med* 36:101–110. doi: 10.3343/alm.2016.36.2.101
- Kanki T and Ohgaki K (2004) **Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA**. *Mol Cell Biol* 24:9823–9834. doi: 10.1128/MCB.24.22.9823

Kasiviswanathan R, Collins TRL and Copeland WC (2012) **The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria.** *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1819:970–978. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.12.005

Khasawneh MK and Abdel-Wahab O (2014) **Recent discoveries in molecular characterization of acute myeloid leukemia.** *Curr Hematol Malig Rep* 9:93–99. doi: 10.1007/s11899-014-0200-y

Kiladjian J-J (2012) **The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012:561–6. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.561

Kim MM, Clinger JD, Masayeva BG, Ha PK, Zahurak ML, Westra WH and Califano JA (2004) **Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions.** *Clin Cancer Res* 10:8512–8515. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0734

Kitamura T, Inoue D, Okochi-Watanabe N, Kato N, Komeno Y, Lu Y, Enomoto Y, Doki N, Uchida T, Kagiya Y et al. (2014) **The molecular basis of myeloid malignancies.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 90:389–404. doi: 10.2183/pjab.90.389

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M and Skoda RC (2005) **A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders.** *N Engl J Med* 352:1779–1790. doi: 10.1056/NEJMoa051113

Kuroiwa T, Nishida K, Yoshida Y, Fujiwara T, Mori T, Kuroiwa H and Misumi O (2006) **Structure, function and evolution of the mitochondrial division apparatus.** *Biochim Biophys Acta* 1763:510–521. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.03.007

Kvasnicka HM (2013) **WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update.** *Curr Hematol Malig Rep* 8:333–341. doi: 10.1007/s11899-013-0186-x

Lee H-C, Li S-H, Lin J-C, Wu C-C, Yeh D-C and Wei Y-H (2004) **Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma.** *Mutat Res* 547:71–8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2003.12.011

Lee W, Johnson J, Gough DJ, Donoghue J, Cagnone GLM, Vaghjiani V, Brown KA, Johns TG and St. John JC (2015) **Mitochondrial DNA copy number is regulated by DNA methylation and demethylation of POLGA in stem and cancer cells and their differentiated progeny.** *Cell Death Dis* 6:e1664. doi: 10.1038/cddis.2015.34

Lee WTY, Cain JE, Cuddihy A, Johnson J, Dickinson A, Yeung K-Y, Kumar B, Johns TG, Watkins DN, Spencer A et al. (2016) **Mitochondrial DNA plasticity is an essential inducer of tumorigenesis.** *Cell Death Discov* 2:16016. doi: 10.1038/cddiscovery.2016.16

Lekovic D, Gotic M, Sefer D, Mitrovic-Ajtic O, Cokic V and Milic N (2015)

Predictors of survival and cause of death in patients with essential thrombocythemia. *Eur J Haematol* 95:461–466. doi: 10.1111/ejh.12517

Levine RL, Wadleigh M, Coombs J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S et al. (2005) **Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.** *Cancer Cell* 7:387–397. doi: 10.1016/j.ccr.2005.03.023

Liersch R, Müller-Tidow C, Berdel WE and Krug U (2014) **Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults – biological significance and clinical use.** *Br J Haematol* 165:17–38. doi: 10.1111/bjh.12750

Lin C, Lee H-T, Lee M, Pan S, Ke C, Chiu A and Wei Y (2016) **Role of Mitochondrial DNA Copy Number Alteration in Human Renal Cell Carcinoma.** *Int J Mol Sci* 17:814. doi: 10.3390/ijms17060814

Liyanage SU, Hurren R, Voisin V, Bridon G, Wang X, Xu C, MacLean N, Siriwardena TP, Gronda M, Yehudai D et al. (2017) **Leveraging increased cytoplasmic nucleoside kinase activity to target mtDNA and oxidative phosphorylation in AML.** *Blood* 129:2657–2666. doi: 10.1182/blood-2016-10-741207

Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, C. Thiede, S.M. Orlando, S. Iacobelli, F. Ferrara, P. Fazi, L. Cicconi EDB, G. Specchia, S. Sica, M. Divona, A. Levis, W. Fiedler, E. Cerqui, M. Breccia, G. Fioritoni, H.R. Salih MC, L. Melillo, A.M. Carella, C.H. Brandts, E. Morra, M. von Lilienfeld-Toal, B. Hertenstein, M. Wattad ML, M. Hänel, N. Schmitz, H. Link, M.G. Kropp, A. Rambaldi, G. La Nasa, M. Luppi, F. Ciceri, O. Finizio AV and F. Fabbiano, K. Döhner, M. Sauer, A. Ganser, S. Amadori, F. Mandelli, H. Döhner, G. Ehninger RFS (2013) **Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia.** *N Engl J Med* 111–121. doi: 10.1056/NEJMoa1300874

Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J et al. (2006) **The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells.** *Nat Genet* 38:431–440. doi: 10.1038/ng1760

Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, Guo G, Hao-Shen H, Dirnhofer S, Orkin SH, Manz MG and Skoda RC (2014) **Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2 -V617F.** *J Exp Med* 211:2213–2230. doi: 10.1084/jem.20131371

Malik AN and Czajka A (2013) **Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction?** *Mitochondrion* 13:481–492. doi: 10.1016/j.mito.2012.10.011

Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, Villeval JL, Raslova H, Kralovics R, Constantinescu SN et al. (2016) **Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis.** *Blood* 127:1317–1324. doi: 10.1182/blood-2015-11-679571

Mascarenhas JO, Orazi A, Bhalla KN, Champlin RE, Harrison C and Hoffman R

(2013) **Advances in myelofibrosis: A clinical case approach.** *Haematologica* 98:1499–1509. doi: 10.3324/haematol.2013.086348

Masuike Y, Tanaka K, Makino T, Yamasaki M, Miyazaki Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Nakajima K, Mori M and Doki Y (2018) **Esophageal squamous cell carcinoma with low mitochondrial copy number has mesenchymal and stem-like characteristics, and contributes to poor prognosis.** *PLoS One* 13:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0193159

Mei H, Sun S, Bai Y, Chen Y, Chai R and Li H (2015) **Reduced mtDNA copy number increases the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic drugs.** *Cell death & Dis* 6:e1710. doi: 10.1038/cddis.2015.78

Mi J, Tian G, Liu S, Li X, Ni T, Zhang L and Wang B (2015a) **The relationship between altered mitochondrial DNA copy number and cancer risk: A meta-analysis.** *Sci Rep* 5:1–10. doi: 10.1038/srep10039

Mi J, Tian G, Liu S, Li X, Ni T, Zhang L and Wang B (2015b) **The relationship between altered mitochondrial DNA copy number and cancer risk: a meta-analysis.** *Sci Rep* 5:10039. doi: 10.1038/srep10039

Mishra P and Chan DC (2016) **Metabolic regulation of mitochondrial dynamics.** *J Cell Biol* 212:379–387. doi: 10.1083/jcb.201511036

Mrózek K, Heerema NA and Bloomfield CD (2004) **Cytogenetics in acute leukemia.** *Blood Rev* 18:115–36. doi: 10.1016/S0268-960X(03)00040-7

Nangalia J and Green TR (2014a) **The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms.** *Hematology* 2014:287–296. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.287

Nangalia J and Green TR (2014b) **The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms.** *Hematology* 2014:287–296. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.287

Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG et al. (2013a) **Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2.** *N Engl J Med* 369:2391–2405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542

Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG et al. (2013b) **Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2.** *N Engl J Med* 369:2391–405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542

Nemer W El, Grandis M De and Brusson M (2014) **Abnormal adhesion of red blood cells in polycythemia vera: A prothrombotic effect?** *Thromb Res* 133:107–111. doi: 10.1016/S0049-3848(14)50018-7

Passamonti F, Mora B and Maffioli M (2016) **New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms.** *Curr Opin Hematol* 23:137–143. doi: 10.1097/MOH.0000000000000218

Perez-De-Arce K, Foncea R and Leighton F (2005) **Reactive oxygen species mediates homocysteine-induced mitochondrial biogenesis in human endothelial cells: Modulation by antioxidants.** *Biochem Biophys Res Commun* 338:1103–1109. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.053

Qu F, Chen Y, Wang X, He X, Ren T, Huang Q, Zhang J, Liu X, Guo X, Gu J et al. (2015) **Leukocyte mitochondrial DNA content: A novel biomarker associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer.** *Carcinogenesis* 36:543–552. doi: 10.1093/carcin/bgv042

Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A et al. (2008) **Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia.** *N Engl J Med* 358:1909–1918. doi: 10.1056/NEJMoa074306

Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN et al. (2007) **JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis.** *N Engl J Med* 356:459–468. doi: 10.1056/NEJMoa065202

Shinyashiki, Roberto. **Os segredos dos campeões.** 1 Edição. Editora Gente, São Paulo, 2007, 169 p.

Spikings EC, Alderson J and St John J (2007) **Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development.** *Biol Reprod* 76:327–35. doi: 10.1095/biolreprod.106.054536

Steensma DP, Caudill JSC, Pardanani A, McClure RF, Lasho TL and Tefferi A (2006) **MPL W515 and JAK2 V617 mutation analysis in patients with refractory anemia with ringed sideroblasts and an elevated platelet count.** *Haematologica* 91:155–156.

Sun X and St John JC (2016) **The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis.** *Biochem J* 473:2955–71. doi: 10.1042/BCJ20160008

Tefferi A and Vardiman JW (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: **The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms.** *Leukemia* 22:14–22. doi: 10.1038/sj.leu.2404955

Tefferi A and Barbui T (2015) CME Information : **Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and management.** *AM J Hematol* 90:163–173. doi: 10.1002/ajh.00043

Tefferi A, Wassie E a., Guglielmelli P, Gangat N, Belachew A a., Lasho TL, Finke C, Ketterling RP, Hanson C a., Pardanani A et al. (2014) **Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients.** *Am J Hematol* 89:121–124. doi: 10.1002/ajh.23743

Thomas RR, Khan SM, Portell FR, Smigrodzki RM and Bennett JP (2011) **Recombinant human mitochondrial transcription factor A stimulates**

mitochondrial biogenesis and ATP synthesis, improves motor function after MPTP, reduces oxidative stress and increases survival after endotoxin. *Mitochondrion* 11:108–118. doi: 10.1016/j.mito.2010.08.004

Toms A V, Deshpande A, McNally R, Jeong Y, Julia M, Kim CU, Gruner SM, Ficarro SB, Marto J a, Griffin JD et al. (2014) **HHS Public Access. Nat Struct Mol Biol** 20:1221–1223. doi: 10.1038/nsmb.2673.Structure

Tu H, Gu J, Meng QH, Kim J, Davis JW, He Y, Wagar EA, Thompson TC, Logothetis CJ and Wu X (2015a) **Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes and the aggressiveness of localized prostate cancer.** *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.5889

Tu H, Gu J, Meng QH, Kim J, Davis JW, He Y, Wagar EA, Thompson TC, Logothetis CJ and Wu X (2015b) **Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes and the aggressiveness of localized prostate cancer.** *Oncotarget* 6:41988–41996. doi: 10.18632/oncotarget.5889

Vardiman J and Hyjek E (2011) **World Health Organization Classification, Evaluation, and Genetics of the Myeloproliferative Neoplasm Variants.** *Hematology* 2011:250–256. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.250

Vardiman JW, Thiele J ADEA (2008) **The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** *Blood* 114:937–952. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA and Bloomfield CD (2015) **The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** 114:937–952. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.

Wang Y, Hu L, Zhang X, Zhao H, Xu H, Wei Y, Jiang H, Xie C, Zhou Y and Zhou F (2017) **Downregulation of mitochondrial single stranded DNA binding protein (SSBP1) induces mitochondrial dysfunction and increases the radiosensitivity in non-small cell lung cancer cells.** *J Cancer* 8:1400–1409. doi: 10.7150/jca.18170

Wanrooij S and Falkenberg M (2010) **The human mitochondrial replication fork in health and disease.** *Biochim Biophys Acta* 1797:1378–1388. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.04.015

Weerts MJA, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, Foekens JA, Sleijfer S and Martens JWM (2016) **Mitochondrial DNA content in breast cancer: Impact on in vitro and in vivo phenotype and patient prognosis.** *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.8688

Woods BA and Levine RL (2015) **The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies.** *Immunol Rev* 263:22–35. doi: 10.1111/imr.12246

Wray J, Kalkan T and Smith AG (2010) **The ground state of pluripotency.** *Biochem Soc Trans* 38:1027–32. doi: 10.1042/BST0381027

Wu CW, Yin PH, Hung WY, Li AF, Li SH, Chi CW, Wei YH and Lee HC (2005)

Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes, Chromosom Cancer* 44:19–28. doi: 10.1002/gcc.20213

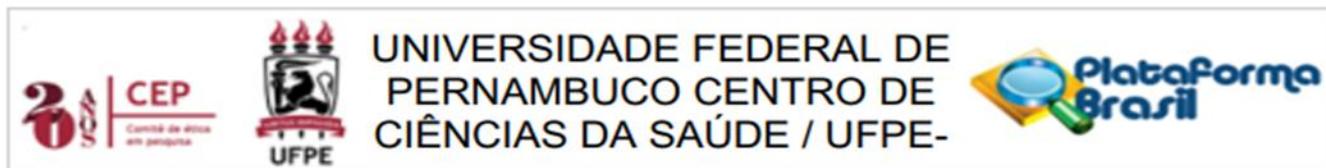
Yang K, Kolanowski JL and New EJ (2017) **Mitochondrially targeted fluorescent redox sensors.** *Interface Focus.* doi: 10.1098/rsfs.2016.0105

Yonal-hindilerden I, Daglar-aday A, Akadam-teker B, Yilmaz C and Nalcaci M (2015) **The Burden of JAK2V617F Mutated Allele in Turkish Patients With Myeloproliferative Neoplasms.** *J Clin Med Res* 7:161–170. doi: 10.14740/jocmr2047w

Zhang SP, Li H and Lai RS (2015) **Detection of JAK2 V617F mutation increases the diagnosis of myeloproliferative neoplasms.** *Oncol Lett* 9:735–738. doi: 10.3892/ol.2014.2801

Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB and Zhao ZJ (2005) **Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera.** *J Biol Chem* 280:22788–22792. doi: 10.1074/jbc.C500138200

ANEXOS A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPACTO PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA DO ADULTO

Pesquisador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 77527717.4.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 04 de Dezembro de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXOS B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****MAIORES DE 18 ANOS****(resolução 466/12)**

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa " Avaliação molecular do número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) em neoplasias hematológicas de origem mieloide", que está sob a responsabilidade do pesquisador Guilhermy Victor Sousa de Araujo (Endereço: Rua São Rafael, nº 103, casa, Alberto Maia, Camaragibe, PE, CEP: 54771-540 – Fone: (81) 9.9656-9416 – E-mail: guilhermy_victor@hotmail.com) e sob a orientação do pesquisa: Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 9.9159-4676 - araujoarl@hotmail.com), Dr. Marcos Andre Cavalcanti Bezerra ((81) 9.9800-8105 - macbezerra@bol.com.br).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o (a) Sr.(a) não será penalizado(a) de forma alguma. O (a) Sr. (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

As neoplasias hematológicas são cânceres das células do sangue. Essas doenças afetam crianças e adultos impedindo a boa funcionalidade das células sanguíneas, causando anemia, alterações nos glóbulos brancos, e sangramento. De curso clínico muitas vezes agressivo. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas levava ao melhor entendimento da doença contribuindo para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e prognósticas aumentando a qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

Avaliação molecular do número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) em neoplasias hematológicas de origem mieloide

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo " Avaliação molecular do número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) em neoplasias hematológicas de origem mieloide", como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data

Assinatura do participante

Impressão Digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO C - Curriculum vitae (Lattes)

Guilhermy Victor Sousa de Araújo

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Guilhermy Victor Sousa de Araújo

Dados pessoais

Filiação Severino Correia de Araújo Filhos e Maria Sueli Sousa de Araújo

Nascimento 14/10/1991 - Recife/PE - Brasil

Carteira de Identidade 7729831 sds - PE - 29/12/2004

CPF 088.027.124-84

Endereço residencial Avenida Doutor Francisco Correia
Centro - São Lourenço da Mata
54735000, PE - Brasil
Telefone: 81 96569414

Endereço eletrônico

E-mail para contato : guilhermy.araujo@ufpe.br

E-mail alternativo guilhermy_victor@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2016 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Avaliação molecular do mtDNA em neoplasias hematológicas de origem mieloide.
Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo
Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2012 - 2015 Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: INVESTIGAÇÃO DO PERFIL MUTACIONAL DO GENE DNMT3A EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA
Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Graduação interrompido(a) em Ciências Biológicas - Bacharelado.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Ano de interrupção: 2012

Formação complementar

2017 - 2017 Curso de curta duração em Treinamento da Plataforma Brasil. (Carga horária: 4h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil

2015 - 2015 Oncologia, Células-Troco e Terapia Celular. . (Carga horária: 80h).
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, FUNDHERP, Ribeirão Preto, Brasil

Atuação profissional

1. Sociedade Brasileira de Genética - SBG

Vínculo institucional

2016 - 2016 Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Tutor , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
I Curso de Biologia Molecular: Técnicas e Diagnóstico Clínico, realizado em parceria com o Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial - NHCL.

2. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Vínculo institucional

2018 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrando , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Desenvolvimento de projeto de pesquisa em oncohematologia, intitulado como SIGNIFICADO CLÍNICO DO NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE DNA MITOCONDRIAL (mtDNA) EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM MIELOIDE. Vinculado ao programa de Pós-Graduação em Genética- UFPE, sob Orientação do Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo.

3. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2018 - 2018 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitor do VI Curso de Interpretação do Hemograma da Universidade Federal de Pernambuco.

Atividades

01/2012 - 07/2014 Estágio, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos
Estágio:
Estágio voluntário no laboratório de coleção de micro-organismos no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
 2. Hematologia
 3. ONCO-HEMATOLOGIA
-

Idiomas

- Inglês** Compreende Pouco , Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente
- Espanhol** Compreende Razoavelmente , Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. FRANCA NETO, P. L.; SILVA, J. L. C.; **ARAÚJO, G. V. S.**; BRANCO, G. V. M. C.; SOBREIRA, M. J. V. C.; BATISTA, T. H. C.; SANTOS, G. M.; SILVA, E. N.; BEZERRA, M. A. C.; ARAUJO, A. R. L.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF JAK2, MPL, AND CALR MUTATIONS OF PATIENTS WITH PRIMARY MYELOFIBROSIS, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários; Local: Centro de Convenções do Hotel Windsor Oceânico; Evento: V Congresso Internacional Oncologia D'Or

2. **ARAÚJO, G. V. S.**; SILVA, J. L. C.; MARTINS, D. A. P.; BATISTA, T. H. C.; SOBREIRA, M. J. V. C.; SANTOS, G. M.; SILVA, E. N.; BEZERRA, M. A. C.; ARAUJO, A. R. L.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF MITOCHONDRIAL DNA CONTENT IN PATIENTS MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASM PHILADELPHIA NEGATIVE, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários; Local: Centro de Convenções do Hotel Windsor Oceânico; Evento: V Congresso Internacional Oncologia D'Or

3. **ARAÚJO, G. V. S.**; BRANCO, G. V. M. C.; SANTOS, G. M.; BEZERRA, M. A. C.; ARAUJO, A. R. L.

INFLUÊNCIA DO NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE NDA MITOCONDRIAL (MTDNA) EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM MIELOIDE, 2017. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Evento: VII Jornada de Pós-Graduação de Genética; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Pernambuco

4. **ARAÚJO, G. V. S.**; SILVA, J. L. C.; MARTINS, D. A. P.; FRANCA NETO, P. L.; ARAUJO, A. S.; ANJOS, A. C.; BEZERRA, M. A. C.; ARAUJO, A. R. L.

HIGH LEUKOCYTE MITOCHONDRIAL DNA CONTENT IN SICKLE CELL DISEASE, 2016. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: Universidade Federal de Pernambuco; Evento: XXI Encontro de Genética do Nordeste; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Genética

5. OLIVEIRA, M. M.; BEZERRA, M. F.; BRANCO, G. V. M. C.; SILVA, J. L. C.; **ARAÚJO, G. V. S.**; BEZERRA, M. A. C.; ARAUJO, A. R. L.

IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO DNMT3A EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: CentroSul Centro de Convenções de Florianópolis/SC; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO

6. **ARAÚJO, G. V. S.**; MARTINS, D. A. P.; SILVA, J. L. C.; FRANCA NETO, P. L.; ARAUJO, A. S.;

BEZERRA, M. A. C.; ARAUJO, A. R. L.

INTERGENIC HBS1L-MYB POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT OF MYELOID NEOPLASMS AND CLINICAL FEATURES, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO**, 2017. (Congresso)

.

2. **VII Jornada de Pós-Graduação de Genética, na Universidade Fderal de Pernambuco**, 2017. (Outra)

INFLUÊNCIA DO NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE NDA MITOCONDRIAL (MTDNA) EM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE ORIGEM MIELOIDE.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO**, 2016. (Congresso)

INTERGENIC HBS1L-MYB POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH DEVEDEVELOPMENT OF MYELOID NEOPLASMS AND CLINICAL FEATURES.

4. Apresentação Oral no(a) **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro)

HIGH LEUKOCYTE MITOCHONDRIAL DNA CONTENT IN SICKLE CELL DISEASE.

Organização de evento

1. **ARAÚJO, G. V. S.**

VI Curso de Interpretação do Hemograma, 2018. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais : Brasil/Português.

2. **ARAÚJO, G. V. S.**

VII Jornada de Pós-Graduação de Genética, 2017. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais : Brasil/Português.

3. **ARAÚJO, G. V. S.**

I Curso de Biologia Molecular: Técnicas e Diagnóstico Clínico, 2016. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais : Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos.....	1
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	8
Apresentações de trabalhos (Outra).....	2

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	4
Participações em eventos (seminário).....	1
Participações em eventos (simpósio).....	3
Participações em eventos (encontro).....	2
Participações em eventos (outra).....	3
Organização de evento (outro).....	3

Outras informações relevantes

.