



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MARIANNY FERNANDA TEIXEIRA PACHECO

**PESQUISA DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE *TP53* E AVALIAÇÃO DO
SEU IMPACTO NO PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA *DE NOVO***

Recife

2019

MARIANNY FERNANDA TEIXEIRA PACHECO

**PESQUISA DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE *TP53* E AVALIAÇÃO DO
SEU IMPACTO NO PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA *DE NOVO***

Dissertação ou Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de mestre em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Recife

2019

Catalogação na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Pacheco, Marianny Fernanda Teixeira

Pesquisa de variantes genéticas no gene *TP53* e avaliação do seu impacto no prognóstico da leucemia mielóide *aguda de novo* / Marianny Fernanda Teixeira. – 2019.

79 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Leucemia aguda 2. Câncer – Aspectos genéticos. 3. Citogenética. I. Araújo, Antonio Roberto Lucena (orientador). II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (coorientador). III. Título.

616.99419

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 – 164

MARIANNY FERNANDA TEIXEIRA PACHECO

**PESQUISA DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE *TP53* E AVALIAÇÃO DO
SEU IMPACTO NO PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA *DE NOVO***

Dissertação ou Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de mestre em Genética.

Aprovada em: 27 /02 /2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Will de Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, força e sabedoria para superar as dificuldades, iluminando meus caminhos. Aos meus pais Edvane e Mário pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por todo esforço para que eu chegasse até aqui. Em especial à minha avó Darci por tanto carinho e cuidado, e minha avó Maria que sempre acreditou que eu chegaria até aqui

A todo grupo NHCL, em especial aos meus orientadores Antonio Roberto e Marcos André por todo conhecimento transmitido durante esses anos. Meus amigos de laboratório com quem compartilhei tantas ideias, risadas e muitas preocupações nesse período. As minhas PPGGirls: Aleide, Flávia, Jéssica Vitória e Jéssica Maria por tantas situações juntas, principalmente a Aleide por ter sido meu braço direito e muitas vezes até o esquerdo. A Flavinha pela companhia e que apesar da distância sempre está junto e apoiando tudo.

As meninas (Jéssica, Denise, Kaká, Hellen) com quem convivi esse período e que tiveram que me aguentar em meus momentos mais chatos e que não foram poucos. Aos meus amigos desde a graduação com quem aprendi tanto, em especial a Rayssa por tantas conversas, gordices e momentos que passamos e tenho certeza que ainda teremos muitos outros.

E por fim, ao programa PPGG, aos órgãos de fomento e aos hospitais pelo suporte durante esse período.

RESUMO

Embora a frequência de variantes mutacionais no *TP53* seja significativamente menor em neoplasias hematológicas, esse gene possui diversas variantes polimórficas. Alguns estudos destacam que essas variantes podem ser úteis para avaliação prognóstica dos pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA). No presente trabalho, o principal objetivo foi determinar a frequência de variantes no gene *TP53* em pacientes adultos com LMA e associar esses achados com os principais desfechos clínicos da doença (sobrevida global e sobrevida livre de doença). Um total de 61 pacientes com LMA *de novo* foram sequenciados. A pesquisa das variantes foi realizada por sequenciamento *Sanger*. Para tanto, foram desenhados seis pares de *primers* que se sobrepõe, a fim de abranger toda extensão do gene. As variantes genéticas encontradas tiveram seu impacto analisado pelo software *PolyPhen2*. Em nossa análise nenhuma variante mutacional foi encontrada, porém foi possível identificar diversas variantes polimórficas dentre elas merece destaque a R72P que é um potencial modulador das atividades apoptóticas da proteína p53. A frequência dessa variante foi: 21,3% Arg/Arg (não Pro-Pro), 54,1% Arg/Pro (não Pro-Pro) e 24,6% Pro/Pro. Apesar dessa variante estar relacionada a susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores, o *Polyphen-2* demonstrou um efeito benigno dessa variante com um *score* de 0,083, ou seja, 8,3% de chances de causar algum dano a estrutura da proteína. As demais variantes não foram analisadas devido seu baixo impacto para o desenvolvimento de tumores.

Palavras-chave: LMA. Alterações genéticas. Desfecho clínico.

Abstract

Although the frequency of mutational variants in TP53 is significantly lower in hematological malignancies, this gene has several polymorphic variants. Some studies have pointed out that these variants may be useful for the prognostic evaluation of patients with acute myeloid leukemia (AML). In the present study, the main objective was to determine the frequency of genetic variants in the TP53 gene in adult patients with AML and to associate these findings with the main clinical outcomes of the disease (overall survival and disease free survival). A total of 61 patients with AML were sequenced. Screening for *TP53* variants was performed by *Sanger* sequencing. To do so, six pairs of primers were designed to overlap, in order to cover the entire length of the gene. The genetic variants found had their impact analyzed by the PolyPhen2 software. In our analysis, no mutational variant was found; however, it was possible to identify several polymorphic variants among them the R72P which is a potential modulator of the apoptotic activities of the p53 protein. The frequency of this variant was: 21.3% Arg / Arg (no Pro-Pro), 54.1% Arg / Pro (no Pro-Pro) and 24.6% Pro / Pro. Although this variant was related to susceptibility to tumor development, Polyphen-2 demonstrated a benign effect of this variant with a score of 0.083, thus 8.3% chance of causing some damage to the protein structure. The other variants were not analyzed due to their low impact for the development of tumors.

Key words: AML. Genetics alterations. Clinical outcome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Organização estrutural do gene <i>TP53</i>	19
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da proteína p53.....	20
Figura 3- Interação da proteína MDM2 com a p53.....	21
Figura 4 - Figura esquemática demonstrando os domínios estruturais da proteína p53 e a frequência de mutações encontradas nessas regiões	27
Figura 5 - Classificação morfológica da FAB de 1976.....	34
Figura 6 - Exposição esquemática da variante R72P.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação Franco-Americano-Britânico (FAB) de 1985 para as leucemias mielóides agudas	34
Quadro 2 - Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2016 para as leucemias mielóides agudas	37
Quadro 3 - Estratificação de risco proposta pelo grupo <i>European LeukemiaNet</i> para subtipos de LMA, segundo critérios citogenéticos e moleculares.	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - (a) Sobrevida global de pacientes com leucemia mielóide aguda <i>de novo</i> não promielocítica. (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda <i>de novo</i> não-promielocítica.	51
Gráfico 2 - (a) Sobrevida global de pacientes com leucemia mielóide aguda <i>de novo</i> não promielocítica frente a variante R72P. (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com leucemia mielóide aguda <i>de novo</i> não promielocítica frente a variante R72P...	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para pesquisa de variantes genéticas no gene TP53.	46
Tabela 2 - Proporções de reagentes utilizados para os sequenciamentos.....	46
Tabela 3 - Características clínico-laboratoriais dos 61 pacientes com leucemia mielóide aguda observadas ao diagnóstico	50
Tabela 4 - Descrição da localização e da frequência genotípica das variantes polimórficas encontrados na análise do gene TP53.	53
Tabela 5 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo categorizados de acordo com o status da variante R72P do gene TP53	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
A	Adenina
<i>ABL1</i>	<i>Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene 1</i>
ARG	Arginina
<i>ASXL1</i>	<i>Additional Sex Combs-Like 1</i>
<i>BCR</i>	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
<i>BCR/ABL1</i>	Gene de fusão resultante do cromossomo Filadélfia
C	Citosina
CD	Grupo de Diferenciação
<i>CDK</i>	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
<i>CEBPA</i>	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CTH	Célula Tronco Hematopoiética
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DNMT3A</i>	Gene da DNA Metiltransferase tipo 3 α
<i>DRAM1</i>	<i>DNA-damage-regulated autophagy modulator 1</i>
EDTA	Ácido Etileno-diamino tetracético
EPO	Eritropoietina
EXO1	Exonuclease I
FAB	Franco-Americano-Britânico
FLT3	Tirosino-quinase 3 relacionada ao FMS
G	Guanina

<i>GLUT</i>	<i>Glucose transporter</i>
Hb	Hemoglobina
HEMOPE	Fundação de Hematologia de Pernambuco
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITD	<i>Internal Tandem Duplication</i>
Kb	Quilo Base
KCl	Cloreto de Potássio
LDH	Lactato Desidrogenase
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
ml	Mililitro
<i>MDM2</i>	Murine Double Minute-2
MO	Medula óssea
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Centre for Biotechnological Information</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
NHCL	Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas
<i>NPM1</i>	Nucleofosmina
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Par de Base
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen

Ph	Cromossomo Filadélfia
PRO	Prolina
Pu	Purina
Py	Pirimidina
RAR α	Receptor do ácido <i>all-trans</i> retinóico α
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SAP	<i>Shrimp Alkalyne Phosphatase</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SER	Serina
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doenças
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SP	Sangue Periférico
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THR	Treonina
<i>TP53</i>	Tumor Supressor 53
TRC	Taxa de Remissão Completa
TR	Taxa de Recaída
<i>ULK1</i>	<i>UNC-51-like autophagy-activating kinase 1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 TUMOR PROTEIN 53 (TP53)	18
2.2 FUNÇÕES DA P53	21
2.2.1 Parada do ciclo celular	22
2.2.2 Senescência.....	23
2.2.3 Apoptose	23
2.2.4 Outras funções	24
2.3 VARIANTES GENÉTICAS	26
2.3.1 Variantes mutacionais no <i>TP53</i>	26
2.3.2 Variantes polimórficas no <i>TP53</i>	28
2.4 <i>TP53</i> NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA.....	29
2.5 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	30
2.6 FISIOPATOLOGIA DA LMA	31
2.7 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA LMA	32
2.8 FATORES PROGNÓSTICOS NA LMA.....	38
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	43
4.2 CASUÍSTICA.....	43
4.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CLÍNICA	43
4.3.1 Coleta de dados e das amostras.....	43
4.3.2 Diagnóstico de LMA	44

4.3.3 Desfecho clínico	44
4.3.4 Critérios de inclusão e exclusão para análise de sobrevida	45
4.4 ANÁLISE MOLECULAR	45
4.4.1 Extração do DNA genômico	45
4.4.2 Análise de variantes no <i>TP53</i> por sequenciamento de Sanger	45
4.5 BIOINFORMÁTICA	47
4.5.1 Montagem, avaliação dos <i>contigs</i> e classificação das variantes genéticas	47
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
5 RESULTADOS	49
5.1 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES COM LMA DE NOVO	49
5.2 DESCRIÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS ENCONTRADAS NO <i>TP53</i> EM PACIENTES COM LMA DE NOVO	51
5.3 IMPACTO DA VARIANTE R72P NOS PACIENTES COM LMA DE NOVO	54
5.4 INFLUÊNCIA DA VARIANTE R72P NA SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES COM LMA DE NOVO	55
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	71
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – UFPE	71
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	72
ANEXO C - CURRÍCULO VITAE (LATTES)	75

1 INTRODUÇÃO

O *Tumor Protein 53 (TP53)* é um supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 17 mais precisamente na região 17p13.1 contendo aproximadamente 20.000 pares de base (pb). A proteína desse gene (p53) é conhecida como “guardiã do genoma” devido sua função em promover o reparo ou eliminação de células danificadas por meio da inibição do ciclo mitótico, senescência ou direcionar a célula para a apoptose.

Quando comparado com outros genes o *TP53* apresenta uma elevada taxa de variantes tanto mutacionais quanto polimórficas. As variantes mutacionais são encontradas em mais de 50% dos casos de tumores sólidos sendo a maioria nos *hotspots* localizados entre a região dos éxons 5 e 8. Com relação as variantes polimórficas já foram validadas mais de 100 polimorfismos localizados principalmente nos íntrons e nos éxons não codificados. Ademais, estudos demonstram que algumas dessas variantes podem estar associadas com a susceptibilidade para desenvolvimento de tumores e um pior prognóstico da doença.

No que diz a respeito as variantes polimórficas encontradas no *TP53* a que apresenta maior destaque é a R72P devido seu efeito na susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores de mama, hepático, pulmão e outros. Essa variante resulta na troca de resíduo de arginina por um de prolina no códon 72 comprometendo algumas funções da proteína, principalmente a capacidade de induzir a apoptose celular. Apesar do alelo Pro 72 ser descrito como um fator de mau prognóstico na maioria dos casos, na leucemia mielóide aguda (LMA) essa alteração não tem seu papel totalmente esclarecido com relação ao risco de desenvolvimento da LMA ou se possui um efeito protetor.

Com relação as variantes mutacionais nos pacientes com LMA é observado uma redução da frequência dessas alterações em comparação com outros tumores, onde as variantes mutacionais estão presentes em menos de 10% dos casos. A presença de variantes mutacionais nesse gene está relacionada com uma pior resposta a quimioterapia, um prognóstico inferior e a um maior risco de recaída em pacientes com cariótipo complexo que é a presença de três ou mais alterações citogenéticas.

A LMA corresponde ao grupo de neoplasias hematológicas clonais, originadas a partir de um progenitor hematopoiético anômalo que adquiriu progressivamente alterações genéticas, levando à desregulação das vias de proliferação, morte celular e perda da capacidade de diferenciação. Devido a essa desregulação ocorre o acúmulo de células hematopoiéticas imaturas (blastos) na medula óssea, interferindo na hematopoese normal. Se em grande quantidade, alcançam o sangue periférico e são capazes de infiltrar outros órgãos, como o fígado, baço e pele.

Ainda que a LMA seja tratada como um conjunto de doenças, dentro desta entidade há uma ampla variedade morfológica, imunofenotípica, citogenética e molecular, as quais podem definir o curso clínico da doença. Neste sentido, a estratificação de risco para avaliação prognóstica das LMAs é de extrema importância, uma vez que permite agrupar os pacientes com base no seu perfil de marcadores prognósticos, podendo, desta maneira, prever a evolução clínica dos pacientes e assim direcioná-los para o protocolo terapêutico mais adequado. Vários fatores são importantes para determinar o prognóstico dos pacientes: idade, contagem de leucócitos e de blastos ao diagnóstico, resultados citogenéticos e moleculares.

Os achados citogenéticos são de grande auxílio na avaliação prognóstica, visto que a detecção de alterações cromossômicas pode ser determinante no direcionamento terapêutico. Um exemplo disso é a t-(15; 17), característica da leucemia promielocítica aguda, cujo tratamento específico com ácido *all-trans* retinóico (ATRA). No entanto, cerca de 50% dos pacientes são caracterizados como citogeneticamente normais. Com base na heterogeneidade clínica e biológica apresentada pelos pacientes, é necessário o estudo de marcadores moleculares para determinar o desfecho dos mesmos. Estudos demonstraram que alterações genéticas no *TP53* possam estar ligadas a evolução clínica da doença e, possivelmente com resistência à quimioterapia durante o tratamento. Desse modo, nos propusemos a pesquisar variantes genéticas no gene *TP53* e avaliar seu impacto no prognóstico de pacientes diagnosticados com LMA do estado de Pernambuco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TUMOR PROTEIN 53 (TP53)

Em 1970 a principal hipótese para o desenvolvimento do câncer levava em consideração que determinados vírus eram responsáveis pela transformação celular, dos quais se destacava o vírus símio 40 (SV40). Estudos funcionais com este vírus destacaram uma proteína com 55k daltons (Da) que precipitava juntamente com o antígeno T maior, sem, no entanto, fazer parte do proteoma do SV40. Desta forma, os autores postularam que esta proteína poderia ser codificada pela célula hospedeira. Posteriormente, Crawford, 1983 descreveu anticorpos no soro humano que marcavam uma proteína com 53kDa em 9% dos pacientes com câncer de mama sendo estabelecido que essa proteína era a mesma já descrita anteriormente, então foi nomeada de p53 (Kress et al. 1979, Linzer e Levine 1979, Melero et al. 1979, Crawford, 1983).

Inicialmente descrito como um oncogene estudos realizados em 1989, entre eles o de Finlay et al. revelou que a proteína p53 selvagem codificada pelo gene *TP53* tinha a capacidade de suprimir o crescimento e a transformação tumoral de células em cultura (Finlay et al. 1989). A sua atividade de supressor tumoral foi comprovada experimentalmente usando camundongos com marcação do gene. Camundongos knockout para o *TP53* (*TP53^{-/-}*) desenvolveram tumores com uma frequência de 100%, levando assim o *TP53* a ser reconhecido como um supressor tumoral (Donehower et al. 1992; Jacks et al. 1994).

O *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 mais precisamente na região 17p13.1 contendo aproximadamente 20.000 pares de base (pb). A organização estrutural desse gene é feita por 11 éxons apresentando uma região 5'-UTR (do inglês, *untranslated region*) no éxon 1 e em parte do éxon 2, uma região 3'-UTR em parte do éxon 11 e a região codificante entre os éxons 2 e 11. Vale ressaltar que o éxon 1 não codificante está separado do restante da sequência por um íntron conservado que ocupa mais da metade do gene (10.739 pb). O gene *TP53* ainda apresenta éxons alternativos localizados no éxon 9, sendo o 9 α a forma regular para formação da proteína selvagem, 9 β e 9 γ envolvidos na síntese de transcritos de *splicing* alternativos que codificam as várias isoformas da proteína p53 (Figura 1). A

literatura descreve mais de 8 transcritos para o *TP53*, com uma frequência variável que são gerados por meio do *splicing* alternativo e/ou uso de promotores internos (Hainaut et al 2016). Esses transcritos alternativos diferem da forma selvagem pela ausência do domínio amino-terminal ou pela alteração do domínio carboxi-terminal (Monette et al. 2012, Kim et al. 2016, Cowen et al. 2017, Wang et al 2017).

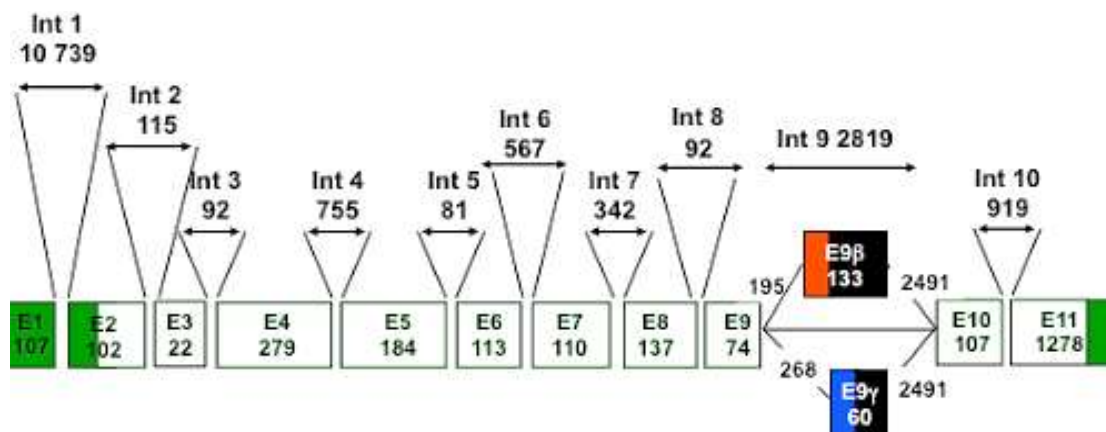


Figura 1: Organização estrutural do gene *TP53*. As regiões destacadas pela cor verde representam as UTRs (Untranslated Region) e a região codificante está na cor branco. Os éxons e íntrons estão demonstrados pelas letras E e I, respectivamente e informam seu tamanho em pares de base (pb). Ainda demonstrando os éxons alternativos formados por E9β e E9γ responsáveis pelas isoformas da proteína.

Fonte: <http://p53.fr/tp53-information/tp53-knowledge-center> (modificada).

A proteína selvagem formada por este gene é uma fosfoproteína nuclear tetramérica com aproximadamente 393 aminoácidos. A p53 apresenta em sua estrutura a região N-terminal que possui os domínios de ativação transcricional e uma região rica em prolina; uma região central com domínio de ligação ao DNA capaz de reconhecer e se ligar aos elementos responsivos a p53 e a região C-terminal que é constituída por um domínio de tetramerização e um domínio não específico de ligação ao DNA que reconhece e se liga ao DNA danificado (Figura 2). Esta proteína funciona como um “sensor” ao estresse celular, danos ao DNA, sinais de hiperproliferação e disfunções metabólicas que levarão seu acúmulo no núcleo, com consequente ativação de sua função (Saha et al 2015, Lazo 2017, Sullivan et al. 2017).

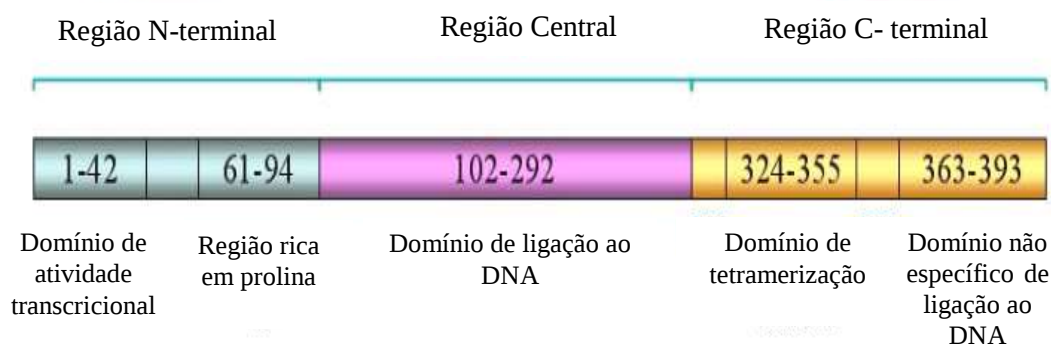


Figura 2: Representação esquemática da estrutura da proteína p53. A p53 é formada 393 aminoácidos distribuídos ao longo das regiões N-terminal, Central e C-terminal. A região N-terminal inclui o domínio transcricional e a região rica em prolina; a região central contém o domínio de ligação ao DNA e a região C-terminal formada por domínio de tetramerização e o domínio não específico de ligação ao DNA.
Modificado de Bai et al 2006

Em células normais, a p53 é mantida em baixos níveis, principalmente por meio da atividade da proteína MDM2 (do inglês, *Murine Double Minute-2*). Esta apresenta diferentes maneiras de atuar como um regulador negativo da p53, dos quais merece destaque a capacidade da MDM2 em se ligar ao domínio de transativação da p53, e, desta forma, impedir sua capacidade de ativar a transcrição, além de possuir uma sequência de sinais semelhantes ao sinal de exportação nuclear de proteínas virais. Assim, quando a MDM2 encontra-se ligada a p53, esta induz sua exportação do núcleo impedindo que a p53 exerça suas funções. A MDM2 pode ainda funcionar como uma ubiquitina-ligase, capaz de marcar a p53 e induzir sua degradação pelo proteassoma. Já em condições de estresse celular, ocorre um aumento significativo da concentração da p53 com modificações pós-traducionais específicas, como fosforilação dos resíduos Ser15, Thr18, Ser20 no caso do dano ao DNA. Esta fosforilação inibe a ligação da MDM2 na p53, consequentemente evitando a degradação da proteína (Figura 2). Outra maneira de garantir o acúmulo da p53 é por meio da ativação de oncogenes (*c-MYC* ou *RAS*) que irão induzir supressores tumorais específicos (por exemplo, ARF), que, por sua vez, inibirá a ação da MDM2 sobre a p53 (Aberg et al. 2017, Aubrey et al 2017, Merkel et al. 2017).

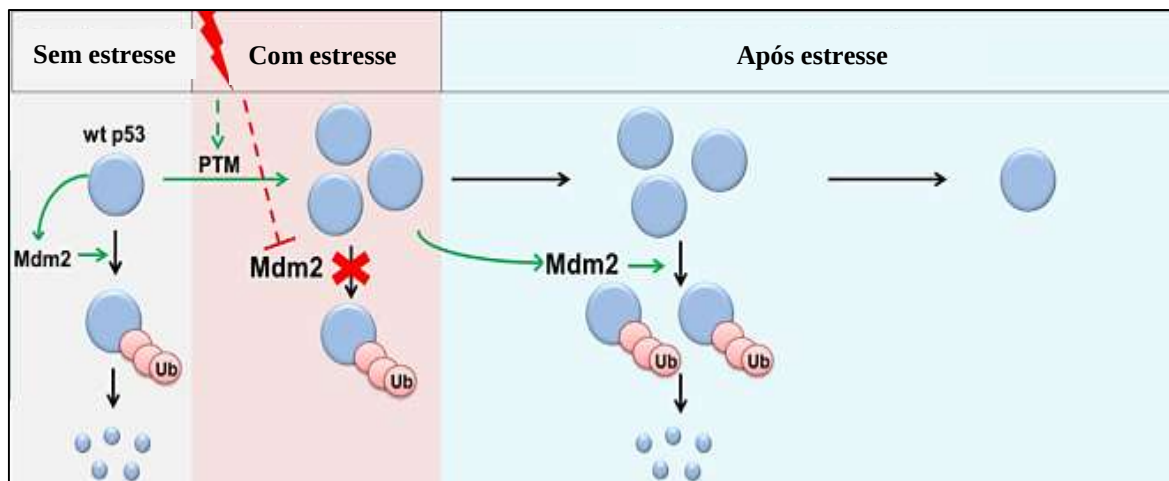


Figura 3: Interação da proteína MDM2 com a p53. Uma das maneiras da p53 manter seu nível por basal é por meio da degradação mediada pelo MDM2 que funciona como uma ubiquitina ligase capaz de marcar a proteína. Em condições de estresse poderá ocorrer modificações pós-traducionais que resultam na estabilização e acúmulo da p53 devido o bloqueio da interação com MDM2. Quando a célula é capaz de se recuperar o estresse sofrido a p53 retorna a seu nível basal por meio do feedback negativo com MDM2.

2.2 FUNÇÕES DA P53

A p53, conhecida como “guardiã do genoma”, apresenta a função de supressão tumoral que é essencial para a integridade do genoma. Por definição, uma proteína supressora tumoral é aquela capaz de limitar a expansão celular inadequada e cuja sua inativação facilita a iniciação ou progressão tumoral (Kastenhuber et al. 2017). Assim, na presença de estresse celular, a proteína p53 será ativada para promover o reparo ou eliminação das células danificadas por meio da inibição do ciclo mitótico, senescência ou direcionando a célula para a morte celular ou apoptose. Embora esses mecanismos de supressão tumoral sejam bem descritos na literatura, estudos recentes mostram que a p53 também pode limitar a formação de tumores por meio da regulação do metabolismo, diminuindo os níveis das espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumentando a autofagia (Muller et. al 2014, Kruiswijk et al. 2015, Duffy et al. 2017, Merkel et al. 2017).

A atividade de fator de transcrição apresentada pela proteína p53 acontece por meio da formação de um complexo homotetramérico, formado pela associação de dois dímeros da proteína p53. Dessa forma, esse tetrâmero é capaz de reconhecer e se ligar as sequências consenso nos elementos responsivos a p53 que consistem em uma sequência *motif* com 10 pares de base

5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (Fischer 2017, Sullivan et al. 2017), regulando positivamente ou negativamente a expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular, apoptose e/ou senescência.

2.2.1 Parada do ciclo celular

O ciclo celular tem como principal objetivo a replicação do DNA com a posterior segregação dos cromossomos garantindo que o material genético seja distribuído igualmente entre as células filhas. O ciclo celular das células somáticas é constituído pela fase de síntese do DNA (fase S) e pela mitose (fase M), as quais são separadas por intervalos (G1 e G2, respectivamente). A regulação do ciclo é feita por meio de ciclinas que são expressas durante as diferentes fases; estas, por sua vez, são responsáveis por regular a família de ciclinas dependentes de quinase (CDKs) que quando fosforiladas resultam na progressão do ciclo celular (Sherr et al 2016).

Estudos tem demonstrado que a parada do ciclo celular é a primeira opção da célula na tentativa de reparar o dano presente no DNA. A p53 é uma proteína essencial no mecanismo de *checkpoint* durante a fase G1 do ciclo celular, assim evitando o acúmulo e a propagação de mutações para as células filhas. A proteína codificada por esse gene tem como papel a ativação transcricional da proteína p21, cuja a função é se ligar aos complexos ciclina E/CDK2 e ciclina D/CDK4 causando a parada do ciclo celular na fase G1 (Chen et al. 2016). A p21 também pode interagir com o PCNA (do inglês, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e inibir a replicação do DNA *in vitro* que pode contribuir para a atividade de parada do ciclo celular (Speidel et al 2015, Sherr et al 2016, Perri et al. 2016, Kastenhuber et al. 2017).

Vale ressaltar que a ativação da p53 também está envolvida com a parada do ciclo celular na fase G2/M, por meio da interação com genes alvos como *14-3-3 σ* e seu produto será um regulador negativo de CDKs. Outro mecanismo de parada na fase G2/M é por meio da ligação da p53 em um sítio do promotor do gene *Cdc25C* responsável por mediar a entrada da célula na fase de mitose. Este gene quando ligado a p53 terá uma regulação negativa da sua transcrição, então essa repressão poderá acarretar a parada do ciclo celular (Chen et al. 2016, Winter et al 2016, Roy et al. 2017).

2.2.2 Senescência

Diferentemente da parada do ciclo celular que é um processo reversível após o reparo, a célula quando em senescência possui a parada permanente do seu ciclo celular. É importante destacar que apesar da parada do seu ciclo, essas células estão metabolicamente ativas e são capazes de expressar diversas proteínas secretoras, também possuem características específicas como aumento de tamanho, autofagia e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Normalmente, a senescência celular é atribuída a modificações nos telômeros, danos ao DNA, hipóxia e espécies reativas de oxigênio que desencadeiam uma resposta de dano ao DNA, e consequentemente a ativação da p53 (Lasry et al 2015, Chen et al. 2016).

A p53 está envolvida na senescência celular através da ativação de diversos fatores transcricionas como Cdkn1a, PML, Pail e E2f7. A ativação da p53 tem múltiplos efeitos na expressão gênica, dentre esses fatores expressos o mais relevante em relação a senescência é a ativação da p21. A ativação da p53 e p21 nas células senescentes é um processo temporário, pois essas proteínas tem seus níveis diminuídos após a parada do crescimento celular. Quando a expressão da p21 é diminuída outro inibidor de *CDK*, a p16, é ativo constitutivamente, assim sugerindo que seja responsável pela manutenção da parada do crescimento nas células senescentes (Rufini et al. 2013, Aubrey et al 2016).

2.2.3 Apoptose

Em condições em que o reparo do DNA não for realizado de maneira eficaz, a p53 direcionará a célula a mecanismos de apoptose prevenindo a proliferação de células anormais (Yanada et al. 2016). Dessa forma a proteína p53 é responsável por interagir com uma série de outras proteínas capazes de controlar a morte celular programada.

Os principais alvos da p53 responsáveis por regular a apoptose são PUMA, Noxa e Bax, todos pertencentes a família BCL-2 que é considerada o controlador principal da via intrínseca da apoptose. Com a presença do estímulo apoptótico as proteínas PUMA e Noxa são reguladas positivamente através da ativação da p53, enquanto proteínas anti-apoptóticas (BCL2, BCL-XL, BCL-W) terão a diminuição da sua regulação, assim levando a um desequilíbrio do

balanço entre as proteínas da família BCL-2 (Speidel et al 2015, Vogler et al 2017).

Essa alteração no balanço das proteínas leva a ativação de BAK e BAX que são proteínas efetoras capazes de se agrupar nos poros da membrana mitocondrial, assim levando a permeabilização da membrana externa mitocondrial e liberação do citocromo c no citosol. A liberação do citocromo c resulta na formação do apoptossoma através do recrutamento de APAF-1 e pro-caspase 9, seguida da ativação da caspase 9 através da clivagem proteolítica, dessa forma levando a apoptose (Ashkenazi et al 2017, Cassier et al. 2017).

A apoptose também pode ser ativada por meio da via extrínseca que inclui os receptores DR4, DR5, assim como FAS que são membros da família de receptores TNF e são induzidos pela p53. Quando o FAS liga-se ao seu receptor FAS-L ocorre a formação de um complexo que leva ao recrutamento da proteína FADD com a pro-caspase-8, formando o complexo de sinalização indutor da apoptose. Esse complexo causa a ativação proteolítica da caspase-8 que por sua vez irá ativar as caspases-3 e -7 que são necessárias para o processo de apoptose caspase dependente (Ouyang et al. 2012, Cassier et al 2017).

2.2.4 Outras funções

Apesar das funções clássicas realizadas pela p53 já serem bem estabelecidas na literatura, outras funções com uma ação de supressão tumoral também tem sido atribuídas a essa proteína. Dentre essas funções está a alteração do metabolismo celular, onde a rápida proliferação celular e o crescimento anabólico são característica da doença neoplásica que necessita de uma reprogramação metabólica. A reprogramação metabólica, característica das células neoplásicas, caracteriza-se pelo efeito Warburg, no qual a glicose é predominantemente metabolizada pela glicólise no lugar da fosforilação oxidativa mesmo em condições aeróbicas (Warburg 1956, Aubrey et al 2016).

Com base no efeito Warburg foi verificado que a proteína p53 é responsável por regular genes que estão envolvidos em eventos metabólicos. A p53 irá se opor a esse processo oncogênico de reprogramação metabólica estimulando a fosforilação oxidativa através da ativação da síntese de citocromo oxidase 2 (Soc2), assim como inibindo a glicólise por meio da repressão dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 que irão reduzir a absorção de

glicose, assim causando uma diminuição da glicólise. A p53 também ativa o gene regulador de glicólise e apoptose induzido por *TP53* (TIGAR) que codifica a enzima frutose fosfatase que inibe a glicólise e aumenta a produção de NADPH (Bieging et al. 2014, Ko et al. 2016).

Com relação ao controle dos níveis de ROS é necessário que ocorra uma regulação dos mecanismos antioxidantes celulares para evitar a toxicidade associada à ROS, assim uma possível desregulação desses processos pode contribuir para o desenvolvimento de neoplasias. A p53 possui um mecanismo capaz de regular o sinal oxidante e controlar o estresse oxidativo, esse processo acontece visto que os genes responsáveis por codificar enzimas antioxidantes como *Gls2*, *Sestrin 1* e *Sestrin 2* foram identificados como sendo alvos de transcrição da p53 (Aubrey et al. 2016, Idelchik et al. 2017).

A autofagia é um processo em que proteínas citoplasmáticas e organelas são envolvidas por vesículas autofágicas que por sua vez irão se fundir com os lisossomos resultando na degradação do conteúdo. Esse processo promove a reciclagem de componentes celulares e fornece energia servindo como um mecanismo de sobrevivência em condições de falta de nutrientes, assim como pode manter a integridade celular através da remoção de componentes que causam danos celulares (Bieging et al 2014, Singh et al 2017). Desse modo, dependendo das circunstâncias apresentadas a autofagia pode promover ou inibir a formação de tumores.

Acerca da associação da autofagia com a p53 verificou-se que essa proteína pode ativar a expressão de um determinado conjunto de genes envolvidos com o processo autofágico como o *DRAM1* (do inglês, *DNA-damage-regulated autophagy modulator 1*), *ULK1* (do inglês, *UNC-51-like autophagy-activating kinase 1* e *cathepsin D*. Além disso também foi demonstrado que a autofagia pode direcionar a resposta da p53. A proteína ATG7 envolvida no processo autofágico se liga à p53 e promove a parada do ciclo e a sobrevivência celular através da ativação da p21. Assim, quando acontece a perda da ATG7 ocorre o processo de troca da resposta da p53 que altera da parada do ciclo celular para a apoptose (Lee et al. 2012, Kruiswijk et al. 2015).

2.3 VARIANTES GENÉTICAS

2.3.1 Variantes mutacionais no *TP53*

Em 1989, cerca de dez anos após a descoberta da proteína p53, estudos feitos por Baker et al. (1989), Nigro et al. (1989), and Takahashi et al. (1989) demonstraram que o gene supressor tumoral *TP53* apresentava uma alta taxa de variantes mutacionais em diversos tipos de tumores (Baker et al 1989, Nigro et al 1989, Takahashi et al 1989). Mais de vinte cinco anos após esses estudos, a era do sequenciamento genômico confirmou o *TP53* como sendo o gene mutado mais associado ao câncer. Esse gene encontra-se mutado na maioria das células somáticas dos tumores, com o *TP53* mutante sendo identificado em mais de 50% dos tumores sólidos. Variantes mutacionais germinativas também podem acontecer no *TP53* e estão associadas com a síndrome de Li-Fraumeni, onde os portadores dessa síndrome apresentam uma maior predisposição para o desenvolvimento de tumores como câncer de mama precoce, tumores cerebrais, tumores adrenocorticais, leucemias e sarcomas (Cole et al. 2017).

As alterações no *TP53* podem em alguns casos ser do tipo inserções e deleções (causando *frameshift*) ou nonsense, porém na maioria das vezes ocorre mutações missense que levam a substituição de um único aminoácido da proteína. As variantes mutacionais missense acometem mais de 70% de todas alterações encontradas no *TP53*, já do total de alterações missense cerca de 80% estão localizadas na região do gene responsável por codificar o domínio de ligação ao DNA (DBD). Vale destacar que as mutações também podem afetar outros domínios, porém com menos hotspots como acontece com a região de transativação (TA), região rica em prolina (PR) e o domínio de oligomerização (OD) (Muller et al. 2014, Perri et al. 2016) (Figura 4).

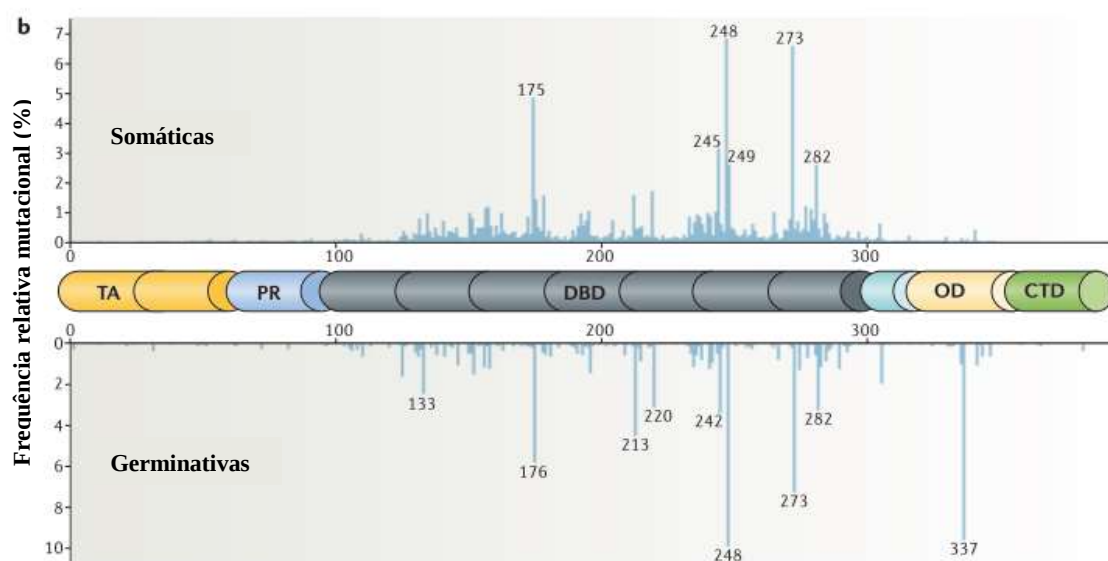


Figura 4: Figura esquemática demonstrando os domínios estruturais da proteína p53 e a frequência de mutações encontradas nessas regiões. Os gráficos representam a frequência de mutações missense ao longo dos domínios da p53 baseados em dados de 1.509 tumores com mutações germinativas no *TP53* e 27.852 tumores esporádicos encontrados no banco de dados International Agency for Research of Cancer (IARC *TP53*). Modificado de Sabapathy et al. 2017

As variantes mutacionais missense podem ser classificadas em dois grupos principais: “mutações de contato com DNA” como os hotspots R273H e R248Q que afetam diretamente os resíduos de aminoácidos que interagem com o DNA, e portanto alterando a habilidade de ligação ao DNA. O outro grupo é o de “mutações conformacionais” como R175H e R249S que alteram o dobramento e a estrutura da proteína p53 afetando indiretamente a capacidade de ligação da proteína mutada. Uma variante encontrada fora da região DBD é a R337H localizada no domínio de oligomerização e está presente em indivíduos com Li-Fraumeni. O resultado dessa mutação é a ruptura da ponte de sal dos monômeros (Arg337 – Arg352) levando desestabilização parcial da tetramerização da p53, assim aumentando a propensão para a formação de fibras amiloides e causando uma disposição para o carcinoma adrenocortical (Galea et al. 2005, Sabapathy et al. 2017).

As mutações no *TP53* geralmente levam a perda ou diminuição da atividade da p53 selvagem, e como essa proteína atua como um tetrâmero é possível que as proteínas mutantes funcionem como inibidores negativos dominantes em relação a p53 selvagem remanescente (Muller et al. 2014).

Ademais, as mutações nesse gene podem permitir uma vantagem adicional para os tumores, uma vez que a proteína mutada pode adquirir funções para promover a formação de tumores. Esse conceito de “ganho de função” (GOF) foi demonstrado através de experimentos, onde certos alelos *TP53* mutados possuíam características capazes de produzir um fenótipo distinto dos nulos. As características de ganho de função apresentadas pela proteína mutada é a capacidade de aumentar a invasão celular e a metástase, em alguns casos também é possível verificar o aumento a resistência aos medicamentos e a angiogênese (Aschauer et al. 2016, Furth et al. 2017, Kastenhuber et al. 2017).

Nem todas variantes mutacionais encontradas demonstraram algum ganho de função, por exemplo estudos feitos com camundongos constatou que as variantes G245S e R246S não expressaram nenhuma característica de GOF, enquanto a R248Q exibiu um desenvolvimento acelerado do tumor em comparação com camundongos p53 nulos. No entanto, o motivo pelo qual apenas algumas proteínas mutadas apresentam o ganho de função ainda não é totalmente esclarecido. Porém, acredita-se que o estado conformacional ou os níveis de expressão da p53 mutada não estão envolvidos, visto que mutações tanto no domínio de ligação ao DNA quanto no domínio de oligomerização apresentam atividade de ganho de função *in vivo* (Lee et al. 2012, Hanel et al. 2013, Sabapathy et al. 2017).

2.3.2 Variantes polimórficas no *TP53*

As variantes polimórficas tem como definição a presença de dois ou mais alelos, onde o alelo menor possui uma frequência maior que 1% na população em estudo. Apesar das variantes polimórficas apresentarem semelhanças com as mutações, essas alterações possuem características que as distinguem dentre elas está a frequência, pois, as mutações têm uma taxa menor que 1% na população (Karki et al. 2015).

O *TP53* possui mais de 100 variantes polimórficas descritas, onde cerca de 90% estão localizados em íntrons ou nos éxons não codificantes. Apesar do número elevado de variantes polimórficas encontradas apenas algumas delas tem seu efeito estudado nas funções da p53. Dentre essas alterações estudadas

as que possuem uma melhor caracterização funcional são as variantes: R72P (rs1042522) e P47S (rs1800371) (Hainaut et al. 2016).

A R72P está localizada no códon 72 (éxon codificante 4), ou seja, na região rica em prolina da estrutura da p53, a qual não tem sua função completamente esclarecida. Essa variante é resultado de uma troca de uma guanina por uma citosina, em que a frequência do alelo menor pode variar de 10 – 50% dependendo da população estudada. Devido a mudança do par de base ocorre a troca do resíduo de arginina (CGC) por um de prolina (CCC) que pode aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores. Ademais, a presença em homozigose da arginina está associada com uma maior frequência de variantes mutacionais somáticas no *TP53* quando comparada com pacientes com genótipo homozigoto para a prolina (McGraw et al 2015, Rebbani et al 2015).

Já a variante P47S está localizada na região de transativação do domínio N-terminal levando a troca de um resíduo de prolina por um de serina no códon 47. A P47S parece estar restrita a descendentes africanos com uma frequência entre 6 – 8% na população africana, visto que essa variante ainda não foi descrita na população caucasiana. Estudos realizados observaram que a Ser variante pode levar a redução dos níveis de apoptose quando comparado com a Pro selvagem. Além disso, a P47S também está relacionada ao desenvolvimento de tumores, visto que em um estudo realizado com camundongos foi observado que tanto os heterozigotos quanto os homozigotos para essa variante apresentaram predisposição para desenvolver carcinoma hepatocelular (Sharma et al 2014, Jennis et al 2016).

2.4 *TP53* NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

A proteína do *TP53* desempenha um papel fundamental na hematopoiese normal e na leucêmica, pois a p53 participa de uma rede de sinalização relacionada com a LMA. Nesse processo a p53 é responsável por regular processos celulares como a manutenção do pool de células tronco normais, dessa forma servindo como uma barreira para formação de neoplasias na célula tronco. Com relação a célula tronco hematopoiética (CTH), a p53 está envolvida

com a quiescência e auto-renovação dessas células a fim de evitar a leucemogênese (Pant et al. 2012, Yanada et al. 2016, Prokocimer et al. 2017).

Como já descrito anteriormente, diversas variantes polimórficas já foram encontradas no *TP53*, onde algumas dessas alterações podem estar associadas a susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores, principalmente a variante R72P. Esse risco pode ser causado pelo fato da Pro72 causar a redução da atividade apoptótica e aumento do risco de desenvolvimento de tumores, enquanto a Arg72 aumenta a indução da apoptose e reduz a transformação celular (Bezerra et al. 2017). Embora a maioria dos estudos descreverem o alelo Pro72 do *TP53* como um fator de mau prognóstico para cânceres humanos, existem evidências de que a variante Pro72 é mais eficiente em ativar genes de reparo ao DNA (Yaghmaei et al 2015) e de induzir a parada do ciclo celular (Pim et al 2004). Particularmente em neoplasias mielóides, a variante Pro72 do *TP53* exerce um efeito protetor contra a LMA relacionada à terapia em indivíduos com níveis mais baixos da proteína MDM2 (Ellis et al 2008).

Com relação as variantes mutacionais o *TP53* apresenta uma elevada frequência na maioria dos tumores. No entanto, quando essa frequência é analisada nos casos de Leucemia Mieloide Aguda (LMA *de novo*) o *TP53* encontra-se mutado em menos de 10% dos casos. De acordo com Kadia et al. a presença de variantes mutacionais nesse gene está relacionada com uma pior resposta a quimioterapia, um prognóstico inferior e a um maior risco de recaída tanto em pacientes com cariótipo complexo que é definido pela presença de três ou mais alterações citogenéticas. Vale destacar que a observação de um pior prognóstico em pacientes com LMA com *TP53* mutado foi independente da idade, cariótipo e outras mutações, como *NPM1 / FLT3-ITD*, *CEBPA*, *RUNX1*, *WT1*, *DNMT3A* e *IDH2* (Hou et al. 2015, Kadia et al. 2016, Aziz et al. 2017). Com base nessas evidências, as variantes mutacionais no gene *TP53* podem servir como marcadores de pior prognóstico para pacientes com LMA.

2.5 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

As leucemias mielóides agudas (LMA) são desordens heterogêneas do tecido hematopoiético, caracterizadas por uma expansão clonal e perda de diferenciação dos progenitores mielóides (blastos) na medula óssea (MO) resultando em uma hematopoese deficiente e na insuficiência da medula óssea.

Essas células podem escapar para o sangue periférico (SP) e se acumularem comprometendo funções de outros órgãos como fígado e baço (Papaemmanuil et al. 2016, Mendinger et al. 2017).

De acordo com Hackel et al. a LMA acomete principalmente adultos com uma idade média de 67 anos no diagnóstico (Hackel et al. 2017). O Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos determinou que a LMA possui uma prevalência de 1,3% dos casos de câncer do EUA. Ainda foi possível estimar que em 2017 houve uma incidência de 21.380 novos casos de LMA, onde 10.590 foram a óbito. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) relata apenas os dados referentes a leucemias no geral, onde em 2018 estima-se 5.940 novos casos para o biênio 2018-2019. Esse valor corresponde a 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres. Ademais, um estudo realizado por Carvalho et al. 2011 no Estado de Pernambuco observou que a LMA representa cerca de 41% de todos os casos de leucemia recebidos no HEMOPE durante o período de 1997 a 2007 (Carvalho et al. 2011, INCA 2016).

A taxa de remissão definida pela presença de menos de 5% de blastos na MO apresenta uma diminuição com o aumento da idade do paciente atingindo 90% em crianças, 70% em adultos jovens, 60% em adultos de meia idade, e 40% em pacientes mais idosos. Vale destacar que com a melhoria do regime terapêutico a LMA é curada em aproximadamente 35-40% dos pacientes idade inferior a 60 anos, no entanto para pacientes idosos (> 60 anos) a sobrevida ainda continua sendo um problema (Rose-Inman & Kuehl 2014, Dohner et al. 2015).

2.6 FISIOPATOLOGIA DA LMA

A patogênese da LMA é um processo complexo influenciado por múltiplos fatores e mecanismos, ainda não totalmente elucidados. Acredita-se que a LMA está associado a um amplo espectro de lesões genéticas adquiridas somaticamente como alterações cromossômicas numéricas e estruturais, alterações no número de cópias, mutações indel e variáveis de nucleotídeo único, que se acumulam na célula tronco leucêmica e consequentemente passam para sua prole. Além disso, o papel de fatores epigenéticos no desenvolvimento da leucemogênese foram identificados nos últimos anos, tais

como metilação anormal do DNA e modificações nas histonas que são mecanismos importantes no silenciamento de supressores tumorais (Hackl et al. 2017, Heidari et al. 2017).

Anteriormente, um modelo proposto por Gilliland et al. denominado “*two-hit model*” explicou que para o desenvolvimento da leucemogênese era necessário duas classes de mutações. As mutações de classe I envolvem genes como *FLT3*, *RAS* e *KIT* relacionados com a transdução de sinal que através da ativação constitutiva de receptores ou na desregulação de transdutores de sinais conferem vantagem proliferativa das células hematopoiéticas e evasão da apoptose. Já as mutações de classe II compreendem as translocações cromossômicas e afetam fatores de transcrição e proteínas envolvidas no controle transcricional, dessa forma contribuindo para o bloqueio da diferenciação mielóide. Exemplos de mutações classe II são as translocações t(8;21), inv(16) e t(15;17) que geram, respectivamente, os rearranjos gênicos *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11* e *PML/RARA*, juntamente com as mutações nos genes *RUNX1*, *CEBPA* e *MLL* (Gary Gilliland e Griffin et al. 2002).

No entanto, com a descoberta de mutações em outros genes o conceito do *two-hit model* foi questionado, visto que nem todos os pacientes com LMA possuem mutações de classe I ou II. Dessa forma sugerindo que vias adicionais podem estar envolvidas na patogênese da LMA. Por exemplo, alterações em genes envolvidos em modificações epigenéticas foram identificados na LMA, e através de estudos foi possível identificar padrões distintos de alterações epigenômicas nos subtipos de LMA (Sanchez et al. 2014).

2.7 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA LMA

O diagnóstico da LMA deve compreender a observação de um quadro clínico agudo do paciente juntamente com a realização de exames complementares essenciais para a confirmação da doença. Normalmente o paciente apresenta um quadro de fraqueza devido a anemia, infecções em virtude da redução de leucócitos normais, sangramentos pela diminuição da produção de plaquetas (plaquetopenia) e ainda hepatomegalia, esplenomegalia, dor óssea devido a infiltração pelas células leucêmicas. No hemograma é possível observar uma anemia normocítica/normocrômica, a contagem dos

leucócitos pode variar de $< 1.000/\mu\text{l}$ a $200.000/\mu\text{l}$ com presença de neutropenia e blastos e plaquetopenia. Ainda segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) ainda é necessário um contagem de pelo menos 20% de blastos na medula óssea para o diagnóstico (Bullinger et al. 2017, Dohner et al. 2017).

Além do hemograma e do mielograma onde é possível observar índices hematimétricos e a morfologia dos blastos respectivamente, outros testes também são necessários como a imunofenotipagem e citogenética que auxiliam na classificação dos subtipos de LMA e no diagnóstico. Por exemplo, a imunofenotipagem é essencial para o diagnóstico e diferenciação das LMAs M0 e M7, quanto as alterações citogenéticas estão presentes em 55-75% dos pacientes diagnosticados com LMA (Estey e Döhner et al. 2006)

A LMA apresenta como característica um pleomorfismo, assim como diferentes comportamentos biológicos, o que levou ao estabelecimento de uma classificação (Bullinger et al. 2010). A classificação das LMAs é baseada em dois principais sistemas o Franco-Americano-Britânico (FAB) e o da Organização Mundial de Saúde (OMS). O sistema FAB criado em 1976 propôs a classificação das LMAs em seis grupos (M1 – M6) baseada em aspectos morfológicos e citoquímicos (Figura 4). Em 1985 houve uma revisão dessa classificação onde critérios imunofenotípicos foram adotados levando a incorporação do subtipo M7 devido a confirmação de blastos plaquetários, e do subtipo M0 através de marcadores monoclonais (Quadro 1) (Bennett et al. 1976, Bennett et al. 1985).

Quadro 1: Classificação Franco-Americano-Britânico (FAB) de 1985 para as leucemias mielóides agudas.

Tipo	Definição	Características
M0	Leucemia indiferenciada	MPO ⁻ por método imunológico CD13 ⁺ , CD33 ⁺ , CD11b ⁺
M1	Leucemia mielóide sem diferenciação	MPO ⁺ > 3% blastos >90% das células nucleadas da M.O.
M2	Leucemia mielóide com diferenciação	% blastos na M.O. >20% e <90% células nucleadas da M.O., componente monocítico <20%
M3	Leucemia promielocítica	Predomínio de células M3(promielócito)
M4	Leucemia mielomonocítica	Similar a M2 Componente monocítico na M.O entre 20% - 80%
M5	Leucemia monocítica	Componente monocítico > 80%
M6	Eritroleucemia	Eritroblastos > 50% das células nucleadas da M.O. Blastos > 30% das células não eritróides
M7	Leucemia megacariocítica	Megacarioblastos > 30% das células nucleadas na M.O.

Legenda: MPO⁺: mieloperoxidase positivo; M.O.: medula óssea; CD: cluster of differentiation

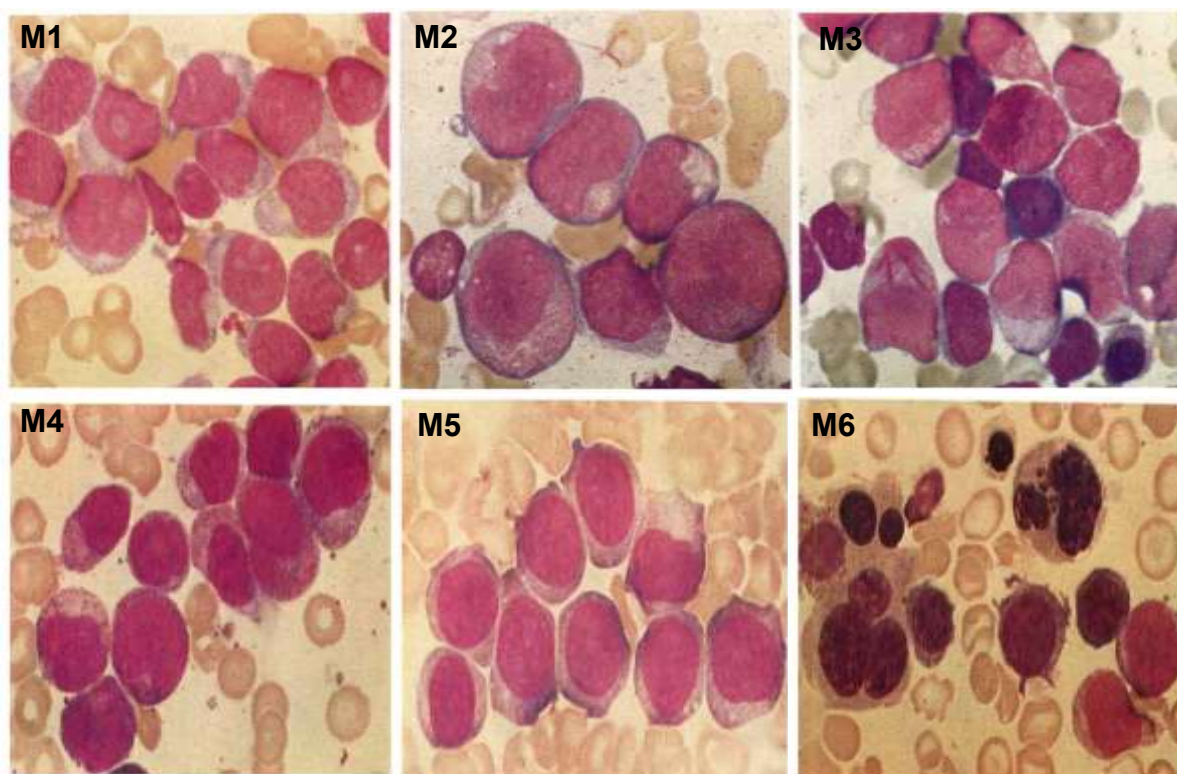


Figura 5. Classificação morfológica da FAB de 1976. Nessa classificação é visualizado a estratificação das LMAs nos subtipos de M1 – M6. Os subtipos M0 e M7 descritos na classificação de 1985 não estão incluídos, pois, não é possível a diferenciação apenas com a morfologia celular Adaptado de Bennett 1976

O intuito principal da classificação FAB era oferecer um diagnóstico objetivo que facilitaria a comparação entre os casos. No entanto, com o aumento da relevância da citogenética a classificação FAB tornou-se ultrapassada por não inserir os achados citogenéticos aos seus subtipos. Devido a essa dificuldade em 2001 a OMS publicou uma classificação inserindo as características citogenéticas. Porém, esse sistema logo tornou-se insatisfatório, pois, cerca de 50% dos casos não é possível identificar nenhuma anormalidade citogenética, sendo esse grupo definido como citogeneticamente normal (LMA-CN). Assim, em 2008 a OMS decidiu agrupar as características citogenéticas com achados moleculares, visto que mutações e alterações na expressão de genes como *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* que estão associados com o processo de leucemogênese e à resposta clínica ao tratamento (Walter et al. 2013, Wakita et al. 2013). Dessa forma, criando um sistema com uma melhor caracterização e estratificação dos pacientes com LMA.

Nos últimos anos, estudos de sequenciamento demonstraram informações adicionais sobre mutações gênicas que influenciaram na classificação da LMA. Dessa forma, a OMS em 2016 atualizou seu sistema com algumas mudanças nas categorias da LMA, porém mantendo seu foco em achados citogenéticos e moleculares. Dentre as modificações realizadas a de maior destaque foi a adição da categoria “neoplasmas mielóides com predisposição de linhagem germinativa”. A inclusão dessa categoria demonstra o aumento de casos de neoplasias mielóides, Síndrome Mielodisplásica (SMD) e LMA, que surgem em associação com mutações germinativas hereditárias ou de novo. Por exemplo mutação germinativa no gene *CEBPA* são observadas em pacientes com LMA com mutação somática no mesmo gene, onde a alteração de origem germinativa predispõem a LMA e alterações somáticas adicionais contribuem para o desenvolvimento da doença (Arber et al. 2016, DiNardo et al. 2016).

Outras alterações realizadas foram a adição provisória da categoria “LMA com *BCR-ABL1*” determinando que pacientes com essa alteração devem receber terapia com inibidores de tirosina quinase, LMA com mutações no *NPM1* e com mutações bialelicas no *CEBPA* tornaram-se entidades definitivas, por fim uma nova categoria provisória foi adicionada “LMA com mutações no *RUNX1*”

que está associada com piores resultados (Quadro 2) (Arber et al, 2016; Dohner et al, 2017).

Quadro 2: Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2016 para as leucemias mielóides agudas

Leucemia Mielóide Aguda e Neoplasias de Células Precursoras Relacionadas

- LMA com anormalidades 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

LPA com PML-RARA

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 (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1

Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1

LMA com mutação NPM1

LMA com mutação bialélica de CEBPA

Entidade provisória: LMA com mutação RUNX1

- LMA com alterações mielodisplásicas relacionadas

- Neoplasia Mielóides relacionadas com terapia

- LMA não classificáveis

LMA com mínima diferenciação

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia Mielomonocítica Aguda

Leucemia Monoblástica e Leucemia Monocítica Aguda

Leucemia Eritroide Pura

Leucemia Megacarioblástica Aguda

Leucemia Basofílica Aguda

Panmielose aguda com mielofibrose

- Sarcoma Mielóide

- Proliferações mieloides relacionadas com síndrome de Down

Mielopoesse anormal transitória (MAT)

Leucemia mielóide associada à síndrome de Down

- Neoplasias de células dendríticas plasmocitóides blásticas

Fonte: Adaptado de Arber et al. 2016

2.8 FATORES PROGNÓSTICOS NA LMA

A estratificação de risco dos pacientes em relação a seu prognóstico é baseada em parte pelas características clínicas como idade do paciente, comorbidades e contagem de leucócitos no SP, também envolve características genéticas incluindo alterações citogenéticas e moleculares que são encontradas no momento do diagnóstico. Assim, as alterações genéticas não são apenas marcadores para o diagnóstico, mas também são consideradas fatores prognósticos capazes oferecer informações como resposta a quimioterapia de indução, risco de recaída e sobrevida global (Ilyas et al. 2015).

A análise citogenética forneceu o primeiro esquema de prognóstico genético para LMA e continua sendo utilizado como esqueleto para a estratificação atual, classificando os pacientes com base em seu cariótipo antes do tratamento. De acordo com a citogenética os pacientes são divididos em três grupos prognósticos: favorável, intermediário e adverso. O grupo favorável inclui a $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22)$ ou $t(15;17)(q22;q21)$, o intermediário inclui pacientes sem alterações citogenéticas (LMA-CN) e os pacientes com LMA portando alguma anormalidade citogenética que não seja considerada no grupo de risco favorável ou desfavorável e o grupo adverso que possui $inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26)$, translocações balanceadas envolvendo 11q23, $t(6;9)(p23;q34)$, $t(1;22)(p13;q13)$ e cariótipo complexo. No entanto, cerca de 50% dos pacientes com LMA apresentam cariótipo normal resultando em uma heterogeneidade no prognóstico devido a alterações moleculares e a resposta ao tratamento (Al-Issa et al. 2016, Di Nardo et al. 2016).

Com o sequenciamento foi possível categorizar mutações recorrentes na LMA e ainda constatou-se que 95% dos casos possuem pelo menos uma mutação somática. Dessa forma, com o impacto que as alterações moleculares exercem no prognóstico dos pacientes foi criado em 2010 o sistema European LeukemiaNet para estratificação de risco levando em consideração alterações citogenéticas e moleculares. Esse sistema foi atualizado e simplificado em 2017, onde atualmente é utilizado um sistema de classificação com três grupos (favorável, intermediário e adverso) no lugar de quatro grupos (favorável, intermediário I, intermediário II e adverso) utilizados na publicação de 2010 (Mendinger et al. 2017).

Outras modificações também foram realizadas, pois, verificou-se que LMA com mutações no *NPM1* ou *CEBPA*, a presença de alterações cromossômicas coexistem parecem não modificar o efeito prognóstico das mutações. Vale ressaltar que as mutações *FLT3-ITD* antes consideradas de prognóstico intermediário agora podem ser classificadas como prognóstico favorável dependendo da taxa alélica. Foi demonstrado que pacientes com *NMP1* mutado e pacientes com *FLT3-ITD* com uma taxa alélica baixa (<0.5) (*FLT3-ITD*^{low}) apresentaram um desfecho semelhante sendo considerados atualmente de prognóstico favorável. Já mutações em *RUNX1*, *ASXL1*, *TP53* e um cariótipo monossomal definido pela presença de uma única monossomia foram associados ao grupo de prognóstico adverso (Quadro 3). Assim, com esse sistema de estratificação é determinado o protocolo terapêutico a ser utilizado após a primeira remissão dependendo do grupo em que o paciente é classificado (Pasquini et al. 2016, Dohner et al. 2017).

Quadro 3: Estratificação de risco proposta pelo grupo *European LeukemiaNet* para subtipos de LMA, segundo critérios citogenéticos e moleculares.

Grupo Genético	Subtipo
Favorável	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> Inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NMP1</i> mutado sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (taxa alélica <0.5) <i>CEBPA</i> bialélico mutado
Intermediário	<i>NPM1</i> mutado e <i>FLT3-ITD</i> ^{high} (taxa alélica ≥0.5) <i>NPM1</i> selvagem sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (sem alterações genéticas de risco adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Alterações citogenéticas não classificadas como favorável ou adversa
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM</i> (<i>EVI1</i>) -5 or del (5q); -7; -17/abn(17p) Cariótipo complexo cariótipo monossomal <i>NPM1</i> selvagem and <i>FLT3-ITD</i> ^{high} <i>RUNX1</i> mutado <i>ASXL1</i> mutado <i>TP53</i> mutado

Fonte: Adaptado de Dohner et al. 2017

Com base na heterogeneidade clínica e biológica apresentada pelos pacientes e visto que a maioria deles apresentam cariótipo normal, é necessário o estudo de marcadores moleculares para determinar o desfecho dos mesmos. Ademais, estudos mostram que mutações em genes específicos são importantes não apenas para o desfecho clínico dos pacientes, mas também desempenham um importante papel no estabelecimento e desenvolvimento do clone leucêmico.

O Cancer Genome Atlas Research Network identificou nove categorias de genes relevantes para a patogênese da LMA, das quais se destacam alterações em genes supressores de tumor, onde o *TP53* representa o principal gene da categoria (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2013). Esses achados sugerem que alterações genéticas no *TP53* possam vir a estar ligadas a evolução clínica da doença e, possivelmente com resistência à quimioterapia durante o tratamento. Dessa forma, numa tentativa de associar esses resultados e uma vez que variantes genéticas no *TP53*, até então, ainda não haviam sido estudadas em Pernambuco em pacientes adultos com LMA *de novo* justifica-se a necessidade do estudo de variantes no *TP53* em pacientes de Pernambuco.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar pacientes adultos com leucemia mielóide aguda *de novo* de acordo com variantes genéticas no gene *TP53*, e associar estes achados com o desfecho clínico e com características clínicas e laboratoriais desses pacientes.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a frequência de variantes genéticas no gene *TP53* em pacientes adultos com LMA de novo;
2. Predizer as possíveis consequências moleculares das variantes no gene *TP53*;
3. Associar a presença de variantes genéticas no gene *TP53* com características clínicas e laboratoriais de pacientes com LMA de novo;
4. Determinar o impacto clínico de variantes genéticas no gene *TP53* nos principais desfechos clínicos da doença (remissão completa, sobrevida global e sobrevida livre de doença).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho é parte de um projeto maior, que objetiva a caracterização de alterações moleculares em LMA, e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/CCS/UFPE) (anexo A). Após a aprovação, foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo B).

4.2 CASUÍSTICA

O estudo é do tipo coorte com comparação de grupos internos, realizado pelo Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial do Laboratório Central do Centro de Biociências (NHCL LabCen/CB/UFPE). Foram incluídos no presente estudo 61 pacientes diagnosticados com LMA e tratados no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, Recife-PE, no período de março de 2010 a novembro de 2018.

Os critérios de exclusão empregados foram: pacientes pediátricos, ausência de dados para diagnóstico de LMA (segundo critérios preconizados pela OMS apresentados previamente durante a revisão bibliográfica), casos de outras neoplasias hematológicas, casos de LMA secundária a neoplasia mieloproliferativa/mielodisplásica, ou ainda indisponibilidade ao acesso dos prontuários dos pacientes para uma caracterização clínica e laboratorial da doença. Por ser considerada uma entidade com características e tratamento próprio, pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) também foram excluídos das análises.

4.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CLÍNICA

4.3.1 Coleta de dados e das amostras

O material utilizado na pesquisa foi o mesmo encaminhado aos laboratórios de rotina para fins diagnósticos, e não foi feita nenhuma coleta

adicional nos pacientes. Foi dada preferência a utilização do material proveniente do aspirado de medula óssea (MO), entretanto, quando este não estava disponível, foi utilizado sangue periférico (SP) anticoagulado em EDTA. Parte dos dados clínicos dos pacientes foram obtidos por meio da análise de prontuário, sempre levando em consideração os resultados do diagnóstico.

4.3.2 Diagnóstico de LMA

O diagnóstico da doença realizado pela Fundação HEMOPE foi estabelecido com base em achados clínicos e laboratoriais de acordo com critérios estipulados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Arber et al. 2016). De acordo com a OMS, para que seja fechado o diagnóstico de uma leucemia aguda, é necessária contagem de blastos na medula óssea e/ou sangue periférico igual ou superior a 20%. Assim, os pacientes foram diagnosticados com base em critérios morfológicos, citoquímicos, imunofenotípicos e achados citogenéticos e/ou detecção dos rearranjos moleculares *PML/RARA*, *CBFB/MYH11* e *AML1/ETO*. Salientando que na presença dos rearranjos gênicos supracitados a contagem igual ou superior a 20% de blastos na medula óssea e/ou sangue periférico não é necessária para o diagnóstico.

4.3.3 Desfecho clínico

Os pacientes vivos foram censurados na data próxima a conclusão da pesquisa e, os demais que tiveram seguimento perdido e/ou sejam submetidos a transplante de medula óssea, foram censurados na última data em que sabidamente estavam vivos ou na data do transplante. Taxa de remissão completa (RC) corresponde ao percentual de pacientes que entraram em remissão após um ou dois ciclos de quimioterapia de indução. Esta remissão foi atestada com aspirados de medula óssea “normocelulares”, ou seja, aqueles que se apresentaram com menos de 5% de blastos na medula óssea e com evidências de maturação normal dos outros elementos após três semanas do final da indução. Sobrevida global (SG) refere-se ao tempo compreendido entre o diagnóstico e o óbito/censura. Sobrevida livre de doença (SLD) é o tempo entre a remissão completa e o primeiro evento (recaída ou óbito) ou censura.

4.3.4 Critérios de inclusão e exclusão para análise de sobrevida

Foram incluídos na análise de sobrevida os pacientes que receberam terapia de indução segundo protocolo padrão preconizado tanto pelo Ministério da Saúde (portaria nº 705, de 12 de agosto de 2014) quanto pela OMS. Este protocolo é conhecido como “3+7” e consiste na administração de antraciclina (daunorrubicina ou idarrubina ou mitoxantrona) durante três dias, seguidos de administração de citosina arabinosídeo durante sete dias. Foram excluídos dessas análises pacientes que receberam outro tipo de tratamento (tratamento paliativo) ou que foram tratados e acompanhados em outros hospitais.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR

4.4.1 Extração do DNA genômico

Para o estudo das mutações no gene *TP53*, foi realizada a extração do DNA genômico a partir do material excedente de sangue periférico ou medula óssea proveniente do diagnóstico do paciente seguindo a técnica de extração com base no fenol-clorofórmio modificado (Davis et al 1986).

4.4.2 Análise de variantes no *TP53* por sequenciamento de Sanger

A pesquisa das variantes do gene *TP53* foram realizadas através da amplificação do DNA por PCR e subsequente sequenciamento do tipo *Sanger*. Os *primers* utilizados na pesquisa foram desenhados utilizando o software CLC MainWorkBench® 6.9.1 (Tabela 1). É importante ressaltar que todos os éxons do gene *TP53* foram sequenciados. Assim, foi necessário amplificar segmentos sobrepostos permitindo a utilização do sequenciamento capilar. Desse modo, as variantes no gene *TP53* foram analisadas por meio de amplicons com aproximadamente 700pb. Abaixo estão listados os oligonucleotídeos utilizados com os tamanhos esperados de amplificação.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para pesquisa de variantes genéticas no gene TP53.

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Produto (pb)
TP53_P1 (éxons 2 e 3)	CCAGGGTTGGAAGTGTCTC	GCATTGAAGTCTCATGGAAG	719
TP53_P2 (éxons 4 e 5)	CATGGTGGTGCACACCTA	GCCACTGACAACCAACCT	749
TP53_P3 (éxons 6 e 7)	AAGGCCTCCCCTGCTTG	TGGTCTCCTCCACCGCT	698
TP53_P4 (éxons 8 e 9)	GTGGAGGAGACCAAGGGT	AACCCAGAAGGCGGAGG	633
TP53_P5 (exon 10)	GCCAGGTGTGGTAGCACAC	ACCATGAAGGCAGGATGA	517
TP53_P6 (exon 11)	CCCTCTCACTCATGTGATG	TCTACCTAACCAGCTGCC	711

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando a *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Initrogen®, ThermoFischer Company, EUA). Antes de submeter os produtos de PCR à reação de sequenciamento, estes foram purificados utilizando o *mix* de enzimas Exo-Sap IT® (USB Laboratories, EUA) composto por Exonuclease I e SAP (*Shrimp Alkalyne Phosphatase*). No sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye Cycle Sequencing®* (Applied BioSystems, EUA), usando a proporção de reagentes listada na tabela 2.

Tabela 2. Proporções de reagentes utilizados para os sequenciamentos.

Reagente	Volume (µL)
Produto de PCR purificado	5,0
Tampão de sequenciamento (5x)	2,0
<i>BigDye Premix®</i>	0,5
<i>Primer</i> (5pmol)	1,0
Água ultrapura	1,5

A precipitação da placa utilizou o protocolo EDTA-acetato de sódio-etanol, em que, sumariamente, os produtos provenientes da reação de sequenciamento são precipitados utilizando 2µL de acetato de sódio 3M pH5,2, 2µL de EDTA 125mM e 50µL de etanol 100% gelado e centrifugados a 2250g por 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado com *spin* da placa invertida

a 180g por 1 minuto. Os produtos foram lavados com etanol 70% gelado e centrifugados novamente a 2250g por 15 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, os produtos foram ressuspensos em *Hi-Di® Formamide* (Applied BioSystems, EUA) no momento da injeção.

O sistema automático utilizado foi o *3500 XL Genetic Analyzer®* (Applied BioSystems, EUA) disponível pelo Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (NPT-CPqAM/FIOCRUZ) e pela plataforma biotecnológica do Centro de Ciência Biológicas. Ao menos duas sequências de cada conjunto de *primers* para cada paciente foram produzidas, obtendo deste modo as sequências referentes às fitas molde e complementar.

4.5 BIOINFORMÁTICA

4.5.1 Montagem, avaliação dos *contigs* e classificação das variantes genéticas

Após confirmação da qualidade das sequências, estas foram comparadas com a sequência de referência (NC_000017.11) referendada pelo *NCBI* (do inglês, *National Centre for Biotechnological Information*). As sequências (*contigs*) foram montadas e avaliadas utilizando o *Software CLC MainWorkBench® 6.9.1*.

Após identificação das alterações, estas foram classificadas nos seguintes tipos: silenciosas (sem alteração na sequência de aminoácidos), *missense* (com substituição de aminoácidos), *nonsense* (com inserção de códons de parada prematuros) e *frameshift* (em que há alteração na matriz de leitura proveniente de inserções e/ou deleções). Em seguida, utilizamos o *software PolyPhen-2* para prever o grau de comprometimento funcional ocasionado pelas variantes encontradas. Este *software* classifica as alterações encontradas de acordo com a sua repercussão na atividade proteica, separando em três tipos: provavelmente prejudicial, possivelmente prejudicial, ou benigna. O escore gerado é a probabilidade da substituição de aminoácidos ser prejudicial e a confiança da previsão é dada pela sensibilidade e especificidade.

É importante destacar, que a ferramenta *Poly-Phen-2* sugere o impacto molecular de mutações levando em consideração as características químicas dos aminoácidos envolvidos na substituição, e se os locais em que há a troca

são estruturalmente importantes para a função efetora da proteína, não havendo com isso, comprovação conclusiva sobre o efeito das mutações.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os pacientes foram classificados de acordo com o genótipo para variante analisada. As variáveis contínuas foram comparadas utilizando os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, enquanto que para variáveis categóricas foi utilizado o teste do *Chi*-quadrado ou teste exato de Fisher.

Sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) foram calculados usando o método Kaplan-Meier. Quando definido o perfil dos pacientes o teste log-rank será 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. Todos os valores de *p* foram *two-tailed*. Assim como anteriormente, as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, EUA). Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES COM LMA *DE NOVO*

Nessa seção está incluído o resultado da caracterização 61 pacientes com LMA *de novo*. A tabela 3 apresenta as principais características clínico-laboratoriais dos pacientes observadas ao diagnóstico. A mediana de idade dos pacientes foi de 49,5 anos (variando de 18 a 76,7) e a prevalência em relação ao gênero foi de 30/31 (feminino/masculino). A frequência dos subtipos FAB foi analisado em 60 pacientes, visto que 1 paciente não possuía a classificação no momento da análise. O subtipo mais frequente foi o M2 24/60 (39,4%) seguido do M4 15/60 (24,6%), não sendo diagnosticado nenhum caso de M6 e M7. A LPA classificada como o subtipo M3 pela FAB apresenta características próprias e tratamento diferenciado dos demais subtipos de leucemia, por isso essa classificação não é analisada junto com os outros casos de LMA.

A análise citogenética realizada nos pacientes demonstrou que 22 (36,1%) apresentaram cariótipo normal, 32 (52,5%) cariótipo alterado e 7 (11,4%) tiveram resultado inconclusivo devido ao pequeno número ou ausência de metáfases. Dos pacientes com cariótipo alterado, seis tiveram cariótipo complexo; dez apresentaram a t(8;21)(q22;q22); oito apresentaram a inv(16); um apresentou del(11q23); um apresentou a inv(9)(p12q13); um apresentou a t(5;11)(q35;p13) e seis apresentaram outras alterações numéricas.

Tabela 3: Características clínico-laboratoriais dos 61 pacientes com leucemia mielóide aguda observadas ao diagnóstico

Características	Pacientes (n = 61)	
	N	%
Sexo		
Masculino	31	50.8
Feminino	30	49.2
Idade (anos), mediana	49.5	
Intervalo	18 – 76.7	
Idade		
18-39 anos	24	39.3
40-59 anos	20	32.8
≥60 anos	17	27.9
Classificação FAB		
M0	7	13,1
M1	10	16.4
M2	24	39.4
M4	15	24.6
M5	4	6.5
M6	0	0
M7	0	0
Ausência de dados	1	-
Citogenética		
Cariótipo Normal	22	40.7
t(8;21)(q22;q22)	10	18.5
inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22)	8	14.8
Trissomia 8	3	5.6
Cariótipo Complexo	6	11.2
del(11q23)	1	1.8
Outros	4	7.4
Ausência de dados ¹	7	-
Estratificação de risco citogenético ²		
Favorável	18	33.3
Intermediário	29	53.7
Adverso	7	13.0
Ausência de dados	7	-
<i>FLT3</i> -ITD		
Mutado	15	24.6
Não-mutado	46	75.4
<i>NPM1</i>		
Mutado	11	18.0
Não-mutado	50	82.0
Grupo de risco molecular ³		
Grupo de baixo risco	7	11.5
Grupo de alto risco	54	88.5
Blastos na médula óssea (%), mediana	63	
Intervalo	20 – 97	
WBC ($\times 10^9/L$), mediana	39.7	
Intervalo	0.6 – 3125	
Hemoglobina (g/dL), mediana	8.1	
Intervalo	4.3 – 13.5	
Plaquetas ($\times 10^9/L$), mediana	42.5	

Siglas: FAB, French-American-British; WBC, white blood cells; *FLT3*-ITD, internal tandem duplication no gene *FLT3*; *NPM1*, nucleophosmin.

Observações:

1. Material não disponível ou metáfases não encontradas.
2. Os grupos de risco citogenético foram definidos de acordo com o critério estabelecido pelo Medical Research Council (MRC).
3. O grupo molecular de alto risco foi definido como *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3*-ITD^{negative}, *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3*-ITD^{positive} ou *NPM1*^{mutado}/*FLT3*-ITD^{positive}.

O grupo de baixo risco molecular foi definido pela presença de mutações no *NPM1* e ausência de mutações *FLT3*-ITD.

Na análise de sobrevida, foram incluídos 57 dos 61 pacientes desse estudo, seguindo os critérios citados previamente no item material e métodos 4.3.4. A mediana da sobrevida global da coorte foi de 109 dias (IC 95%:50 - 167 dias), com sobrevida global estimada em dois anos de 13,8%. Um total de 52 (86,7%) pacientes evoluíram para o óbito dos quais 13 (21,6%) faleceram antes do 30º dia após o diagnóstico (Figura 6a). A sobrevida global livre de doença teve uma mediana de 355 dias (IC 95%:90 – 619 dias). A SLD estimada de dois anos foi de 20,6% (Figura 6b). A taxa de remissão completa (CR) da coorte foi de 41,6% (25/60).

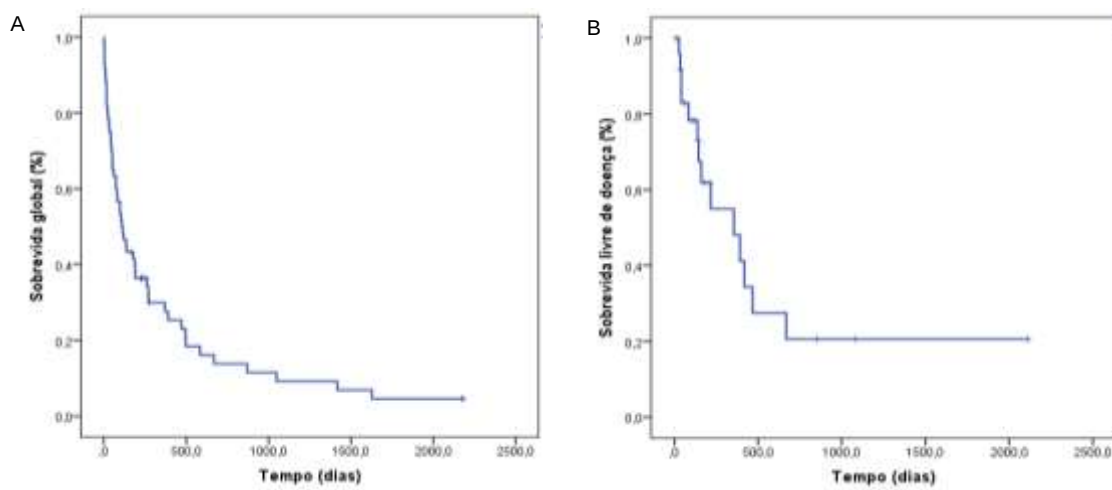


Gráfico 1. (a) Sobrevida global de pacientes com leucemia mielóide aguda *de novo* não promielocítica. (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda *de novo* não-promielocítica.

5.2 DESCRIÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS ENCONTRADAS NO *TP53* EM PACIENTES COM LMA *DE NOVO*

A pesquisa de alterações genéticas em toda extensão do gene *TP53* foi realizada em 61 pacientes com LMA *de novo*. Durante o estudo não foram

encontradas variantes mutacionais no *TP53*, contudo foram identificadas variantes polimórficas tanto de troca de nucleotídeos quanto de inserção de nucleotídeos.

As variantes polimórficas encontradas estão distribuídas em toda extensão do gene. No intron 2 do *TP53* foi observado a presença do SNP rs1642785 (C>G; MAF 0,42) com uma frequência de 89,6% (53/61) em nossa coorte, dos quais 57,4% (37/61) são heterozigotos e 29,5 (18/61) são homozigotos variantes. No íntron 3 foi encontrado dois polimorfismos, o primeiro é o rs17883323 (C>A, MAF 0,08) que está presente em 8,2% (5/61) sendo todos os pacientes heterozigotos para esse SNP. Outra variação encontrada nessa região foi o rs17878362 caracterizado por uma inserção de 16 nucleotídeos que foi constatado em 27,9% (17/61) dos pacientes.

Apesar do éxon 4 ser considerado uma região de hotspot para variantes mutacionais, foi encontrado apenas polimorfismos assim como as outras regiões. O rs1800370 (G>A; MAF 0,01) localizado no éxon 4 foi observado em 4,9% (3/61) dos pacientes, dos quais 3,3% (2/61) são heterozigotos e 1,6% (1/61) é homozigoto variante. Outro SNP encontrado foi o R72P (rs1042522, C>G; MAF 0,46) que já é bem descrito na literatura, esse está presente 78,7% (48/61) da coorte, onde os pacientes heterozigotos apresentaram uma frequência de 54,1% (33/61) e os homozigotos variantes de 24,6% (15/61). No íntron 4 foi encontrado o rs2909430 (G>A; MAF 0,16) com uma taxa de 90,2% (55/61) em nossa coorte dos quais 23% (14/61) são heterozigotos e 67,2% (41/61) são homozigotos variantes.

Outras variantes polimórficas encontradas estão localizadas no íntron 7 e no íntron 9. Os SNPs rs12947788 (C>T; MAF 0,17) e o rs12951053 (T>G; MAF 0,17) ambos localizados no íntron 7 apresentaram a mesma frequência genotípica em nossa coorte sugerindo um possível desequilíbrio de ligação. Essas variantes apresentaram uma frequência de 29,5% (18/61) para heterozigotos, não sendo encontrado homozigotos variantes. Por fim, a última variante encontrada está localizada no íntron 9 que foi a rs12949655 (T>C; MAF 0,17) dos quais 5% (3/61) dos pacientes são heterozigotos e 5% (3/61) são homozigotos variantes (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição da localização e da frequência genotípica das variantes polimórficas encontrados na análise do gene TP53.

Polimorfismo	Localização	Genótipo	N	%
rs1642785	Íntron 2	CC	8	13,1
		CG	35	57,4
		GG	18	29,5
rs17883323	Íntron 3	CC	56	91,8
		CA	5	8,2
		AA	0	0
rs17878362	Íntron 3	NoIns/NoIns	44	72,1
		NoIns/Ins	17	27,9
		Ins/Ins	0	0
rs1800370	Éxon 4	GG	58	95,1
		GA	2	3,3
		AA	1	1,6
rs1042522 (R72P)	Éxon 4	GG (não Pro-Pro)	13	21,3
		GC (não Pro-Pro)	33	54,1
		CC (Pro/Pro)	15	24,6
rs2909430	Íntron 4	GG	6	9,8
		GA	14	23
		AA	41	67,2
rs12947788	Íntron 7	CC	43	70,5
		CT	18	29,5
		TT	0	0
rs12951053	Íntron 7	TT	43	70,5
		TG	18	29,5
		GG	0	0
rs12949655	Íntron 9	TT	55	90
		TC	3	5
		CC	3	5

Siglas: NoIns/NoIns: homozigotos selvagens; NoIns/Ins: heterozigotos; Ins/Ins: homozigotos variantes; Pro: prolina

5.3 IMPACTO DA VARIANTE R72P NOS PACIENTES COM LMA *DE NOVO*

Como descrito anteriormente, variantes mutacionais não foram encontradas em nossa coorte. No entanto, algumas das variantes polimórficas identificadas no presente trabalho já foram descritas em estudos anteriores. Dentre elas, se destaca a variante R72P (rs1042522), principalmente pelo seu impacto funcional na proteína p53.

Na análise por meio do software *Polyphen-2* mostrou que a variante a R72P possivelmente não está relacionada com prováveis danos à estrutura da proteína.

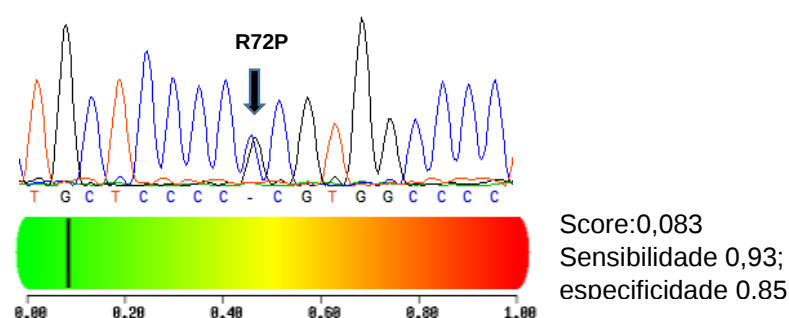


Figura 6. Exposição esquemática da variante R72P. É destacado a substituição no eletroferograma, onde vemos a variante R72P. O gráfico proveniente da análise no *Poly-Phen-2* está localizado abaixo do respectivo eletroferograma evidenciando a probabilidade de dano molecular predita.

A tabela 5 resume as principais características clínico laboratoriais que foram analisadas usando o modelo recessivo de acordo com a presença da Prolina variante (Pro), assim formando os grupos não Pro/Pro (n=46) e o Pro/Pro (n=15). Notamos que os pacientes não Pro/Pro são mais velhos que o grupo Pro/Pro, embora essa diferença não seja significativa ($P= 0,262$). Não houve diferença entre os grupos com relação ao sexo ($P= 0,384$), nem com a classificação da FAB ($P= 0,565$).

Dos 61 pacientes diagnosticados com LMA *de novo*, 7 não possuíam análise citogenética. Dentro do grupo não Pro/Pro foi observado uma maior frequência de anormalidades citogenéticas como: t(8;21)(q22q22) (21,9%), inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22) (9,8%), cariótipo complexo (9,8%), seguidas de outras alterações em menor frequência. Com base nos resultados obtidos da citogenética, os pacientes foram estratificados em grupos de risco, seguindo os

critérios estabelecidos pelo *UK Medical Research Council* (MRC) (Grimwade et al. 2010). Assim, pudemos verificar uma maior frequência dos pacientes distribuídas nos grupos de risco citogenéticos que pertencem a classe não Pro/Pro ($P=0,821$).

Baseados na presença de mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*, os pacientes foram segregados quanto ao risco molecular: o grupo molecular de alto risco foi definido como *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3*-ITD^{negativo}, *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3*-ITD^{positivo}, ou *NPM1*^{mutado}/*FLT3*-ITD^{positivo} e o grupo de baixo risco foi definido pela presença de mutação no *NPM1* com comitante ausência de mutações *FLT3*-ITD. Dentro dos grupos avaliados, a maioria dos pacientes não Pro/Pro e os Pro/Pro pertencem ao grupo de alto risco molecular, entretanto o primeiro grupo apresentou uma maior frequência 43/46 (93%) em relação ao segundo 11/15 (73%) ($P=0,034$).

Apesar das medianas de hemoglobina ($P=0,476$) e plaquetas ($P=0,808$) não apresentarem diferença estatística entre os grupos, a mediana do número de leucócitos demonstrou significância estatística ($P=0,028$) em que o grupo não Pro/Pro possui uma mediana inferior em comparação com o grupo Pro/Pro.

5.4 INFLUÊNCIA DA VARIANTE R72P NA SOBREVIDA DOS PACIENTES COM LMA DE NOVO

Para análise de sobrevida levando em consideração a variante R72P foram incluídos 57 pacientes. A mediana da SG dos pacientes Pro/Pro foi menor em comparação com os pacientes não Pro/Pro, sendo estas 81 dias (IC95%: 1 – 163 dias) e 119 dias (IC95%: 18 – 219 dias) respectivamente, embora essa diferença não tenha sido significativa ($P = 0,384$). A SG estimada em dois anos do grupo Pro/Pro foi de 9,5%, enquanto que para o grupo não Pro/Pro foi de 16,7% (Figura 8a). Na análise de sobrevida livre doença houve diferença estatística entre os grupos Pro/Pro e não Pro/Pro, apresentando a mediana da SLD de 139 dias (IC95%: 15 – 262 dias) e 468 dias (IC95%: 304 – 631) respectivamente ($P= 0,033$) (Figura 8b).

Tabela 5. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo categorizados de acordo com o status da variante R72P do gene TP53

Características	não Pro - Pro (n = 46)		Pro – Pro (n = 15)		P- valor
	No.	%	No.	%	
Sexo					0,384
Mulher	21	46	9	60	
Homem	25	54	6	40	
Idade					0,369
18 - 40	16	35	8	53	
40 - 60	17	37	3	20	
>60	13	28	4	27	
FAB					0,565
M0	5	11,1	2	13,3	
M1	8	17,9	2	13,3	
M2	20	44,4	4	26,7	
M4	10	22,2	5	33,4	
M5	2	4,4	2	13,3	
Ausência de dados	1	-	-	-	
Citogenética					0,734
Cariótipo normal	17	41,6	5	38,5	
t (5;11)	1	2,4	0	-	
t (8;21)	9	21,9	1	7,7	
t (1;12)	1	2,4	0	-	
Trissomia +4	1	2,4	0	-	
Trissomia +8	2	4,9	1	7,7	
Cariótipo complexo	4	9,8	2	15,4	
del (11q23)	1	2,4	0	-	
inv (16)	4	9,8	4	30,7	
inv (9)	1	2,4	0	-	
Ausência de dados ¹	5	-	2	-	
Risco citogenético ²					0,821
Favorável	13	31,7	5	38,5	
Intermediário	23	56,1	6	46,1	
Adverso	5	12,2	2	15,4	
Ausência de dados	5	-	2	-	
Cariótipo Complexo					0,623
CC	37	90,2	11	84,6	
Não CC	4	9,8	2	15,4	
Ausência de dados	5	-	2	-	
Risco molecular ³					0,034
Baixo risco	3	6,5	4	26,7	
Alto risco	43	93,5	11	73,3	
Idade (anos), mediana	32,5		26,5		0,262
Intervalo	18 – 76		18 – 69		
Leucócitos (x10 ⁹ /L), mediana	28,1		39,7		0,028
Intervalo	600 – 312.500		16.500 – 192.950		
Hemoglobina (g/dL), mediana	31,9		28,1		0,476
Intervalo	4,3 – 13,5		5,3 – 11		
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	30,6		31,9		0,808
Intervalo	6000 – 404.000		20.000 – 215.000		

Nota: 1. Material não analisado ou sem metáfases

2. Os grupos de risco citogenéticos foram definidos de acordo com os critérios do Medical Research Council (MRC).

3. O grupo molecular de alto risco foi definido como *NPM1*não-mutado/*FLT3*-ITDnegativo, *NPM1*não-mutado/*FLT3*-ITDpositivo, ou *NPM1*mutado/*FLT3*-ITDpositivo. O grupo molecular de baixo risco foi definido pela presença que qualquer mutação no *NPM1* e ausência de mutações *FLT3*-ITD.

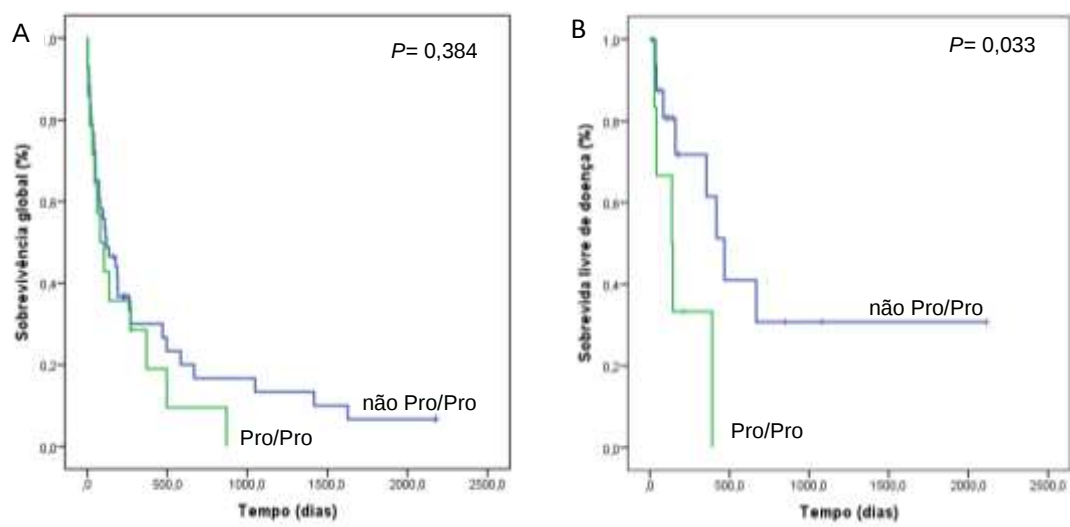


Gráfico 2. (a) Sobrevida global de pacientes com leucemia mielóide aguda *de novo* não promielocítica frente a variante R72P. (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com leucemia mielóide aguda *de novo* não promielocítica frente a variante R72P.

6 DISCUSSÃO

A literatura descreve que variantes mutacionais do *TP53* em pacientes com neoplasias hematológicas são encontradas em uma frequência significativamente menor do que em tumores sólidos (Kastenhuber et al. 2017). No entanto, THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK (2013) observou que a frequência de mutações no gene *TP53* aumenta em 75% quando são analisadas isoladamente em pacientes que apresentem cariótipo complexo (ou seja, aquele com 3 ou mais alterações estruturais no mesmo clone) ao diagnóstico (Kadia et al. 2016). Além disso, esses achados são fortemente associados com um pior desfecho clínico (Stengel et al. 2017).

É importante salientar que em nossas análises foi sequenciado toda a extensão do gene *TP53*. Enquanto, que a literatura apresenta estudos em que apenas as regiões de *hotspots*, as quais compreendem do éxon 5 ao éxon 8 são sequenciadas apresentando uma taxa inferior a 10% de variantes mutacionais nos pacientes com LMA *de novo* (Kadia et al. 2016, Yanada et al. 2016, Hou et al. 2015). Então, em nosso trabalho mesmo sequenciando todas as regiões do gene não foram encontradas variantes mutacionais confirmando a baixa frequência das mutações descrita na literatura. Apesar de não encontrarmos variantes mutacionais, nossas análises evidenciaram várias alterações polimórficas no *TP53*, em sua maioria em regiões intrônicas, corroborando com outros estudos que descrevem o *TP53* como um gene altamente polimórfico (Olivier et al 2010, Kastenhuber et al. 2017).

Dentre as variantes encontradas foi destacada a rs1042522 (R72P) responsável por ser um potencial “modificador” da atividade apoptótica da proteína p53 (McGraw et al 2015). Apesar da literatura descrever a variante R72P como um marcador de mau prognóstico para o câncer de pulmão, mama, carcinoma hepatocelular e outros (Neumann et al. 2017, Yadav et al. 2015, Rebbani et al. 2015), segundo a ferramenta *Polyphen-2*, a R72P apresentou uma baixa probabilidade de dano molecular a função da proteína. Ademais, existem evidências de que o alelo Pro72 é mais eficiente em ativar genes de reparo ao DNA (Yaghmaei et al. 2015) e de induzir a parada do ciclo celular (Pim et al. 2004). Com relação as neoplasias mielóides, a variante Pro72 do *TP53* exerce

um efeito protetor contra a LMA relacionada à terapia em indivíduos com níveis mais baixos da proteína MDM2 (Ellis et al 2008).

Em um trabalho anterior do nosso grupo foi avaliada a frequência desta variante polimórfica em uma coorte de indivíduos saudáveis (224 voluntários) e pacientes adultos com LMA (205 pacientes) diagnosticados e tratados em 2 centros de referência no país (Recife e Ribeirão Preto). O estudo mostrou que a variante Pro72 foi mais frequente em pacientes com LMA. Além disso, pacientes com LMA que foram homozigotos para a mesma variante (ou seja, aqueles com o genótipo Pro/Pro) apresentaram uma sobrevida global significativamente maior que pacientes não-Pro/Pro, particularmente aqueles designados para o grupo intermediário de risco citogenético (Bezerra et al. 2017).

De acordo com o estudo citado acima os paciente com genótipo Pro/Pro tiveram uma mediana da sobrevida global de 264 dias (IC95%:201 – 657 dias), enquanto os pacientes com genótipo não-Pro/Pro apresentaram uma mediana de 114 dias (IC95%: 70 – 158 dias) ($P=0,031$). Quando comparado esses dados com as análises de sobrevida realizadas nesse estudo foi observado que em nossa coorte os pacientes Pro/Pro tiveram uma SG inferior em comparação com os pacientes não-Pro/Pro, sendo estas 81 dias (IC95%: 1 – 163 dias) e 119 dias (IC95%: 18 – 219 dias) respectivamente, porém esse dado não foi significativo ($P= 0,384$). A diferença dos dados de SG entre os genótipos do nosso estudo comparados com de Bezerra et al. pode ser devido ao número limitado de pacientes da nossa coorte, assim podendo não ter demonstrado o efeito dos genótipos frente ao desfecho dos pacientes.

Dentre os fatores prognósticos relacionados às condições de saúde e características do paciente estão idade e contagem de leucócitos, sendo a idade avançada e os quadros de leucocitose indicativos de prognóstico adverso (Vardiman et al. 2009). A variante R72P foi associada com a contagem leucocitária em que o grupo Pro/Pro apresentou uma mediana superior ao grupo não-Pro/Pro ($P= 0,028$), mas não foi encontrado associação com a idade ($P= 0,369$). Ademais, em nossos resultados foi encontrado associação com o risco molecular ($P=0,034$), onde o grupo não-Pro/Pro demonstrou uma maior frequência para classificação de alto risco em relação ao Pro/Pro sugerindo que a Pro72 nos pacientes homozigotos variantes pode apresentar um melhor desfecho clínico.

Dessa maneira, nossas análises sugerem que a variante Pro72 pode ter diferentes comportamentos, a literatura ainda tem investigado a relação entre Arg72Pro e o risco de leucemia, porém o impacto dessa variante na predisposição para leucemia ainda é controverso. Tian et al realizou uma meta análise e observou que essa variante estava associada com risco de leucemia linfóide aguda (LLA), mas não encontrou resultados significativos com a LMA. No entanto, Bezerra e colaboradores demonstraram que o genótipo *TP53* Pro/Pro foi associado com maior risco de leucemia e desfecho favorável em pacientes com LMA tratados com terapia convencional (Tian et al. 2016, Bezerra et al. 2017). É importante destacar que a meta análise conduzida por Tian et al. foi realizada com 14 estudos do tipo caso-controle com população asiática e caucasiana, então seus resultados podem não corroborar com o estudo brasileiro devido ao *background* genético apresentado pela população brasileira.

Portanto, parece que a variante *TP53* Arg72Pro pode ter diferentes funções específicas de tecido e contexto, e a importância prognóstica de cada alelo pode depender do tipo de câncer e do tratamento adotado. Como ainda não foi totalmente esclarecido o impacto biológico desta variante polimórfica na leucemogênese, seria interessante realizar estudos funcionais que relacionem dados apoptóticos com o perfil polimórfico dos pacientes com LMA, a fim de esclarecer os efeitos dessa variante.

7 CONCLUSÃO

- A ausência de variantes mutacionais em nossa coorte com LMA *de novo* demonstrou que o *TP53* possui uma frequência reduzida de variantes mutacionais em comparação com outros tumores;
- O *TP53* demonstrou-se um gene polimórfico, assim como descrito pela literatura;
- O genótipo não Pro-Pro da variante R72P apresentou um melhor desfecho clínico em nossa coorte.

REFERÊNCIAS

- ABERG E, SACCOCCIA F, GRABHERR M, et al. Evolution of the p53-MDM2 pathway. **BMC Evolutionary Biology** 17:177, 2017.
- AHN JS, KIM HJ, KIM YK, et al. Morphological Subtype According to the FAB Classification Correlates with Molecular Subtype Using Genomic Risk Classification Based on Somatic Mutation Profiles in Normal Karyotype AML. **Blood** 130:5075, 2017.
- AL-ISSA K, NAZHA A. Molecular landscape in acute myeloid leukemia: where do we stand in 2016. **Cancer Biology & Medicine** 13:474-482. 2016.
- ARBER DA, ORAZI A, THIELE J, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood** 127:2391-2405, 2016.
- ASCHAUER L, MULEER PAJ. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. **Biochemical Society Transactions** 44:460-466, 2016.
- ASHKENAZI A, FAIRBROTHER WJ et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery** 16:273-284, 2017.
- AUBREY BJ, STRASSER A, KELLY GM. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 2016.
- AUBREY BJ, KELLY GL, JANIC A et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? **Cell Death And Differentiation** 25:104-113, 2017.
- BAKER SJ, FEARON ER, NIGRO JM, HAMILTON SR, PREISINGER AC, JESSUP JM, VANTUINEN P, LEDBETTER DH, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. **Science** 244:217–221, 1989.
- BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR E SULTAN C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol** 33: 451-458, 1976.
- BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL M, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR E SULTAN C. Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7): A Report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann Intern Med** 103: 460-462, 1985.
- BEZERRA MF, et al. Association between the TP53 Arg72Pro polymorphism and clinical outcomes in acute myeloid leukemia. **Haematologica** 102:43-46, 2017.

BIEGING KT, MELLO SS, ATTARDI LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer** 14:359-370, 2014.

BULLINGER L, DOHNER K, DOHNER H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. **Journal of Clinical Oncology**. 2017

BOWEN D, GROVES MJ, BURNETT AK. *TP53* gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. **Leukemia** 23:203-206, 2009.

CASSIER PA, CASTEST M, et al. Targeting apoptosis in acute myeloid leukaemia. **British Journal Of Cancer** 117:1089-1098, 2017.

CARVALHO QGS, PEDROSA WA E SEBASTIÃO QP. Leucemia mieloide aguda versus ocupação profissional: perfil dos trabalhadores atendidos no Hospital de Hematologia de Recife. **Rev Esc Enferm USP**, 45:1446-51, 2011.

CHAUFFAILLE ML, BORRI D, PROTO-SIQUEIRA R, MOREIRA ES, ALBERTO FL. Acute promyelocytic leukemia with t(15;17): frequency of additional clonal chromosome abnormalities and FLT3 mutations. **Leuk Lymphoma** 49: 2387-2389, 2008.

CHEN J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2016.

COLE AJ, ZHU Y, DWIGHT T, et al. Comprehensive analyses of somatic TP53 mutation in tumors with variable mutant allele frequency, 2017.

COSTA S et al. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. **Bmc Cancer** 8:1-7, 2008.

COWEN LE, TANG Y. Identification of non sense-mediated mRNA decay pathway as a critical regulator of p53 isoform β . **Nature** 7:17535, 2017.

DAVIS LG, DIBNER MD AND BATTEY JF. Basic Method in Molecular Biology. **Elsevier**, Londres, 388, 1986.

DINARDO CD, CORTES JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. **American Society of Hematology** 348-355, 2016.

DÖHNER H, WEISDORF DJ, BLOOMFIELD CD. Acute Myeloid Leukemia. **N Engl J Med**, 373:1136–1152, 2015.

DÖHNER H, ESTEY E, GRIMWADE D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood** 129:424-447, 2017.

DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** 356:215-221, 1992

DUFFY MJ, SYNNOTT NC, CROWN J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. **European Journal Of Cancer** 83:258-265, 2017.

ELLIS NA, HUO D, YILDIZ O, et al. MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility **Blood**.112(3):741-749, 2008.

ESTEY E AND DÖHNER H. Acute myeloid leukaemia. **Lancet** 368:1894–1907, 2006.

FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell** 57:1083 – 1093, 1989.

FISCHER M. Census and evaluation of p53 target genes. **Oncogene** 36:3943-3956, 2017.

FURTH N, AYLON Y, OREN M. P53 shades of Hippo. **Cell Death and Differentiation** 25:81-92, 2017.

GARY GILLILAND D AND GRIFFIN JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood** 100:1532–1542, 2002.

HACKL H, ASTANINA K, WIESER R. Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leucemia. **Journal of Hematology & Oncology**. 10:51, 2017.

HAFERLACH C, DICKER F, HERHOLZ H, SCHNITTGER S, KERN W, HAFERLACH T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. **Leukemia** 22:1539–1541, 2008.

HAMADOU WS, et al. Mutational analysis of TP53 gene in Tunisian familial hematological malignancies and sporadic acute leukemia cases. **Familial Cancer** 16:153-157, 2016.

HAINAUT P, PFEIFER GP. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2016.

HANEL W, MARCHENKO N, XU S, et al. Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. 20:898-909, 2013.

HEIDARE N, ABROUN S, VOSOUGUI T, et al. Significance of Inactivated Genes in Leukemia: Pathogenesis and Prognosis. **Cell** 19:9-26, 2017.

Heinze B, et al. Less common genotype variants of TP53 polymorphisms are associated with poor outcome in adult patients with adrenocortical carcinoma. **European Journal of Endocrinology** 170:707-717, 2014.

HOU HÁ, CHOU WC, KUO YY et al. TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution, 2015.

IDELCHIK MPS, BEGLEY U, et al. Mitochondrial ROS control of cancer. Seminars. **Cancer Biology** 47:57-66, 2017.

ILYAS AM, AHAMAD S, et al. Next Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia: Influencing Prognosis. **BMC Genomics** 16:55, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 118, 2018.

JACKS T, REMINGTON L, WILLIAMS BO, et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. **Curr Biol** 4:1-7, 1994.

JHA P, PATHAK P, CHOSDOL K, SURI V, SHARMA MC, KUMAR G et al TP53 polymorphisms in gliomas from Indian patients: study of codon 72 genotype, rs1642785, rs1800370 and 16 base pair insertion in intron-3. **Exp Mol Pathol** 90:167–172, 2011.

JOERGER AC, FERSHT AR. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. **Annual Review Of Biochemistry** 77:557-582, 2008.

KADIA TM, JAIN P, RAVANDI F, et al. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. **Cancer**, 2016.

KARKI R, et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **Bmc Medical Genomics** 8:1-7, 2015.

KASTENHUBER ER, LOWE SW. Putting p53 in Context. **Cell** 170:1062-1078, 2017.

KIM S; AN SSA. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. **Medicine** 95:26-31, 2016.

KRESS M, MAY E, CASSINGENA R. Simian Virus 40-Transformed Cells Express New Species of Proteins Precipitable by Anti-Simian Virus 40 Tumor Serum. **Journal Of Virology** 31:472-483, 1979.

KRUISWIJK F, LABUSCHAGNE CF, VOUSDEN KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. **Molecular Cell Biology** 17:393-405, 2015.

- LANE DP, CRAWFORD LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature** 278: 261–263, 1979.
- LASRY A, BEN-NERIAN Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. **Trends in Immunology**, 36:217-228, 2015.
- LAZO, PA. Reverting p53 activation after recovery of cellular stress to resume with cell cycle progression. **Cellular Signalling** 33:49-58, 2017.
- LIMA AS, DE MELO MR, FERNANDES E. Clinical outcomes of patients with acute myeloid leukemia: evaluation of genetic and molecular findings in a real-life setting. **Blood** 126:1863-1865, 2015.
- LIND H, EKSTROM PO, RYBERG D, et al. Frequency of TP53 mutations in relation to Arg72Pro genotypes in non small cell lung cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**16(10):2077-2081, 2007.
- LINZER D, LEVINE A. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell** 17: 43-52, 1979.
- LUCENA-ARAUJO AR, SOUZA DL, MORATO DE OLIVEIRA F, et al. Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. **Ann Hematol** 89:225-228, 2010.
- MCGRAW KL, et al. The relationship of TP53 R72P polymorphism to disease outcome and TP53 mutation in myelodysplastic syndromes. **Blood Cancer Journal** 5:1-7, 2015.
- MECHANIC LE, et al. Common Genetic Variation in TP53 Is Associated with Lung Cancer Risk and Prognosis in African Americans and Somatic Mutations in Lung Tumors. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention** 16:214-222, 2007.
- MEDINGER M, PASSWEG JR. Acute myeloid leukaemia genomics. **British Journal of Haematology** 179:530-542, 2017.
- MELERO JA, STITT DT, et al. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. **Virology** 93:466–480, 1979.
- MERKEL O, TAYLOR N, PRUTSCH N, et al. When the guardian sleeps: Reactivation of the p53 pathway in cancer. **Mutation Research** 773:1-13, 2017.
- MOURA RR, COELHO AVC, BALBINO VQ, et al. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. **Human Biology**, 2015.

MRÓZEK K, MARCUCCI G, NICOLET D, MAHARRY KS, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol** 30: 4515-4523, 2012.

MULLER PAJ, VOUSDEN KH. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. **Cancer Cell** 25:304-317, 2014.

MUKHAMMADIYEVA GF, KARIMOV DO, et al. TP53 Gene Polymorphisms and Occupational Skin Cancer Risks for Workers of Glass Fiber Manufacture. **Iran J Pub Health** 11:1495-1501, 2017.

NIGRO JM, BAKER SJ, PREISINGER AC, JESSUP JM, HOSTETTER R, CLEARY K, BIGNER SH, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature** 342: 705–708, 1989.

OLIVIER M, HOLLSTEIN M, HAINAUT P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 2:1-17, 2010.

OUYANG L, SHI Z, ZHAO S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation** 45:487-498, 2012.

PAPAEMMANUIL E, GERSTUNG M, BULLINGER L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **N Engl J Med** 23:2209-2221, 2016.

PERRI F, PISCONTI S, SCARPATI GV. P53 mutations and cancer: a tight linkage. **Annals of Translational Medicine** 4:522-522, 2016.

PERRIAUD L, et al. Impact of G-quadruplex structures and intronic polymorphisms rs17878362 and rs1642785 on basal and ionizing radiation-induced expression of alternative p53 transcripts. **Carcinogenesis** 35:2706-2715, 2014.

PIM D, BANKS L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert diferente effects on cell cycle progression. **Int J Cancer**. 108(2):196-199, 2004.

PROKOCIMER M, MOLCHADSKY A, ROTTER V. Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy. **Blood** 130:699-712, 2017.

QUINTAS-CARDAMA A, HU C, QUTUB A et al. p53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status. **Leukemia**, 2016.

ROSE-INMAN H, KUEHL D. Acute Leukemia. **Emerg Med Clin N Am** 32:579–596, 2014.

ROY D, SHENG GY, HERVE S et al. Interplay between cancer cell cycle and metabolism. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 8:288-296, 2017.

RUCKER FG, SCHLENK RF, BULLINGER L, KAYSER S, TELEANU V, KETT H et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. **Blood** 119: 2114–2121, 2012.

RUFFINE A, TUCCI P, CELARDO I, MELINO G. Senescence and aging: the critical roles of p53. **Oncogene** 32:5129-5143, 2013.

SABAPATHY K, LANE DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15:13-30, 2017.

SAHA T, KAR RK, SA G. Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. **Biophysics and Molecular Biology** 1-14, 2015.

SANCHEZ M, LEVINE RL, RAMPAL R (2014) Integrating Genomics Into Prognostic Models for AML. *Seminars in Hematology* 51:298-305.

SCHÖNHERZ AA, BØDKER JS, et al. Acute Myeloid Leukemia Classification System That Associates Normal Myeloid-Cell Subset Gene Signatures with Prognosis. **Blood** 130:2689, 2017.

SCHULZ E, SILL H. The TP53 Pro72Arg SNP in de novo acute myeloid leukemia. **Haematologica** 102:214-215, 2017.

SHERR CJ, BARTEK J. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. **Annual Review Of Cancer Biology** 1:41-57, 2017.

SILVA FB, FIGUEIREDO-PONTES LL, COELHO-SILVA JL. The application of an integrated clinical, cytogenetic, and molecular risk stratification for acute myeloid leukemia patients using a central laboratory in a Brazilian multicentric study. **Blood Advances** 1:86-89, 2017.

SINGH SS, VATS S, CHIA AYQ, et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. **Oncogene** 37:1142-1158, 2017.

SPEIDEL D. The role of DNA damage responses in p53 biology. **Arch Toxicol** 89:501-517, 2015.

STENGEL A et al. the impact of tp53 mutations and tp53 deletions on survival varies between aml, all, mds and clt: an analysis of 3307 cases. **Leukemia**, 31:705-711, 2016.

SULLIVAN KD, GALBRAITH MD, et al. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. **Cell Death and Differentiation** 25:133-143, 2017.

TAKAHASHI T, NAU MM, CHIBA I, BIRRER MJ, ROSENBERG RK, VINOCOUR M, LEVITT M, et al p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. **Science** 246: 491–494, 1989.

TSAI CH, HOU HÁ, TANG JL, et al. Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. **Leukemia** 30:1485-1492..

VOGLER M, WALTER HS, DYER MJS. Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies - from pathogenesis to treatment. **British Journal Of Haematology** 178:364-379, 2017.

WARBURG O. On the origin of cancer cells. **Nature** 123:309, 1956.

WAKITA S, YAMAGUCHI H, OMORI I, TERADA K, UEDA T, MANABE E, KUROSAWA S, IIDA S, IBARAKI T, SATO Y et al. Mutations of the epigenetics-modifying gene (DNMT3a, TET2, IDH1/2) at diagnosis may induce FLT3-ITD at relapse in de novo acute myeloid leukemia. **Leukemia** 27:1044–52, 2013.

WALTER RB, OTHUS M, BURNETT AK, et al. Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly. **Blood** 121:2424-2431, 2013.

WANG C, et al. The study of the relation of DNA repair pathway genes SNPs and the sensitivity to radiotherapy and chemotherapy of NSCLC. **Scientific Reports** 6:1-12, 2016.

WANG W, et al. Characterization of TP53 mutations in low-grade myelodysplastic syndromes and myelodysplastic syndromes with a non-complex karyotype. **European Journal Of Haematology** 99:536-543, 2017.

WINTER M, LODYGIN G, VERDOODT B, HERMEKING H. Deletion of 14-3-3 σ sensitizes mice to DMBA/TPA-induced papillomatosis. **Oncotarget**, 2016.

WU D, ZHANG Z, et al. Intron 3 Sixteen Base Pairs Duplication Polymorphism of P53 Contributes to Breast Cancer Susceptibility Evidence from Meta-Analysis. **Plos One**, 2013.

YADAV P. et al. Clinical significance of TP53 (R72P) and MDM2 (T309G) polymorphisms in breast cancer patients. **Clinical And Translational Oncology** 18:728-734, 2015

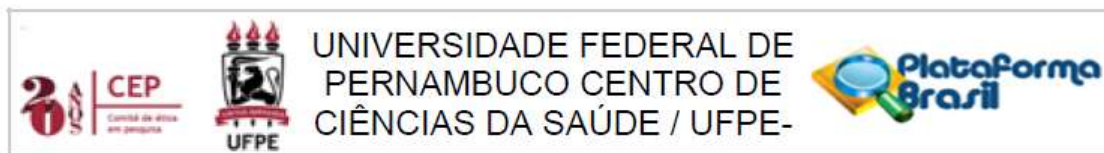
YANADA M, YAMOTO Y, IBA S et al. TP53 mutations in older adults with acute myeloid leukemia. **International Journal Of Hematology** 103:429-435, 2016.

YAGHMAEI M, SALIMI S, NAMAZI L, FARAJIAN-MASHHADI F. Association of XRCC1 Arg399Gln and Tp53 Arg72Pro polymorphisms and increased risk of uterine leiomyoma - A case-control study. **Genet Mol Biol.** 2015;38(4):444-449. 2015.

YANADA M, MORI J, et al. Effect of cytogenetic risk status on outcomes for patients with acute myeloid leukemia undergoing various types of allogeneic hematopoietic cell transplantation: an analysis of 7812 patients. **Leukemia & Lymphoma** 59:601-609, 2017

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA – UFPE



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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.412.470

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma temática atual e interessante para comunidade de pacientes portadores de leucemia mielóide aguda, médica e pesquisadores, pois, visa aumentar o grau de conhecimento, estratégias terapêuticas, de acompanhamento e prognóstico relacionados a esta patologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As cartas de anuência, termo de confidencialidade, currículos e termo de consentimento livre e esclarecido estão devidamente anexados. O orçamento de aproximadamente 28.500,00 reais será de responsabilidade do pesquisador, com suporte financeiro do CNPq (MCTI/CNPQ/Universal processo 444656/20146). O cronograma é factível. A folha de rosto foi devidamente assinada.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 04 de Dezembro de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa “Impacto prognóstico de alterações moleculares em pacientes com leucemia mieloide aguda do adulto”, que está sob a responsabilidade do pesquisador Antonio Roberto Lucena de Araujo, residente a Rua Charles Darwin, número 183, Boa Viagem CEP: 51021-520, telefone: (81) 999089382, email: araujoarl@hotmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Marcos André Cavalcanti Bezerra (81-998008105), Aleide Santos de Melo Lima (81-988358596), Matheus Filgueira Bezerra (81-998734248), Marianny Fernanda Teixeira Pacheco (81-999444491), Guilhermy Victor Sousa de Araújo (81-996569414), Elaine Cristina Fontinele Martins (81-99179-8040) e Fábio Rodrigo Barbosa Dutra Nascimento (81-988612131).

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Essa pesquisa tem como objetivo “avaliar o panorama genético de pacientes adultos com leucemia mieloide aguda (LMA), bem como seu impacto prognóstico nos principais desfechos clínicos da doença (remissão, recaída e morte)”. Serão incluídos na pesquisa pacientes adultos (acima de 18 anos) com diagnóstico de LMA, atendidos e acompanhados no Hospital Hemope, no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). O material a ser analisado na pesquisa será de medula óssea (tutano) e/ou sangue periférico. Essas amostras são coletadas de rotina no momento do diagnóstico e só utilizaremos na pesquisa o material que sobrar dessas análises, não sendo necessária nenhuma coleta adicional, evitando transtornos ao paciente. A pesquisa não pretende modificar o tratamento ou acompanhamento já preconizado para o paciente.

Essa pesquisa não traz riscos adicionais para o paciente, além dos riscos que são intrínsecos aos procedimentos que já seriam realizados na rotina de diagnóstico, pois o seu material biológico será o mesmo utilizado na rotina laboratorial do HCP, IMIP e Hospital Hemope e será encaminhado para a pesquisa somente após seu uso na rotina, sendo utilizado apenas o material que sobrar. Em nenhuma ocasião será coletado material excedente para uso da pesquisa.

Com essa pesquisa pretendemos, futuramente, melhorar o entendimento sobre o desenvolvimento da LMA e o refinamento da análise de prognóstico (classificação de risco) e, assim, poderá haver uma maior adequação do protocolo de tratamento a ser seguido para cada paciente, podendo aumentar as chances de cura.

Apesar de a pesquisa de algumas destas mutações serem preconizadas pela Organização Mundial da Saúde, o alto custo destes exames muitas vezes não permite sua realização nas

instituições públicas ou por custeio próprio do paciente. Nesse contexto, esse projeto se propõe a realizar os testes em questão e fornecer os resultados à equipe dos hospitais envolvidos e aos pacientes.

Todas 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 de prontuário coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador principal, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

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).**

Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo

Pesquisador responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Impacto prognóstico de alterações moleculares em pacientes com leucemia mieloide aguda do adulto”, 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 o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Impressão
digital

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO C - CURRICULO VITAE (LATTES)

Marianny Fernanda Teixeira Pacheco

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Marianny Fernanda Teixeira Pacheco
Filiação Mário Pacheco e Edvane de Fátima Teixeira Pacheco
Nascimento 03/08/1993

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Avaliação de mutações no gene TP53 e seu impacto no prognóstico da leucemia mielóide aguda
 Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo
 Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2011 - 2016 Graduação em Biomedicina.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2013 - 2014 Graduação em Science - Biological Science.
 University of Alberta, UALBERTA, Edmonton, Canadá

Formação complementar

2016 - 2016 Tecnologias de Cultivo de Células Animais. . (Carga horária: 80h).
 Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, FUNDHERP, Ribeirão Preto, Brasil

2016 - 2016 I Curso de Inverno em Genética Humana. . (Carga horária: 30h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2016 - 2016 Extensão universitária em Curso 1000 Lâminas "Citologia Hematológica".
 (Carga horária: 45h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2016 - 2016 EAD - Doença Falciforme. . (Carga horária: 30h).
 Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil

2015 - 2015 III Curso de Interpretação do Hemograma. . (Carga horária: 60h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2015 - 2015 Avaliação Clínica e Laboratorial da Hemostasia. . (Carga horária: 20h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2015 - 2015 Técnicas Avançadas de Biologia Molecular. . (Carga horária: 12h).
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM/FIOCRUZ, Brasil

2012 - 2012 IX Curso de Sensibilização em Biosegurança. . (Carga horária: 18h).
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM/FIOCRUZ, Brasil

2011 - 2011 Produção de Anticorpos. . (Carga horária: 40h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPQAM/FIOCRUZ

Vínculo institucional

2015 - 2015 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica - PIBIC , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Aluna de iniciação científica com o projeto "ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS NK CITOTÓXICAS E REGULATÓRIAS NA INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DA CÉLULA T HUMANA"

2012 - 2013 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica - PIBIC, Regime: Parcial
Outras informações:
Atua na produção de antígenos recombinantes do vírus HIV-1 e na validação dos mesmos através de ensaios de microarranjos líquidos, visando o desenvolvimento de um kit diagnóstico.

2. Ceapro - CEAPRO

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiaria, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Estágio de verão no departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Ceapro qualificando certos polifenóis presentes em grãos de aveia e contribuindo para a produção do artigo de revisão sobre "Avenanthramides".

3. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2016 - 2016 Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 45, Regime: Integral
Outras informações:
Monitora do IV Curso de Interpretação do Hemograma da UFPE.

2015 - 2016 Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor da disciplina de Exames Hematológicos , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitora vinculado à PROACAD/UFPE da disciplina Exames Hematológicos (Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE), ministrada ao curso de Biomedicina; sob orientação do Professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

4. Faculdades Integradas de Patos - FIP

Vínculo institucional

2015 - 2015 Vínculo: Monitora , Enquadramento funcional: Monitora de Pós Graduação , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:

Projetos

Projetos de pesquisa

2017 – Atual PESQUISA DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE *TP53* E AVALIAÇÃO DO SEU IMPACTO NO PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA DE NOVO.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Marianny Fernanda Teixeira Pacheco; Antônio Roberto Lucena de Araújo (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2016 - 2016 AVALIAÇÃO MOLECULAR DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA MITOCONDRIAL (MTDNA) EM PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Marianny Fernanda Teixeira Pacheco; Antônio Roberto Lucena de Araújo (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2015 - 2016 INVESTIGAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE DNMT3A EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Marianny Fernanda Teixeira Pacheco; Antônio Roberto Lucena de Araújo (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2015 - 2015 ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS NK CITOTÓXICAS E REGULATÓRIAS NA INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DA CÉLULA T HUMANA

Descrição:

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Marianny Fernanda Teixeira Pacheco; Heytor Victor Pereira da Costa Neco; Clarice Neuenschwander Lins de Moraes (Responsável)

2012 - 2013 PRODUÇÃO E VALIDAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DO VÍRUS HIV-1 PARA O DESENVOLVIMENTO DE KITS DE DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DE MICROARRANJOS LÍQUIDOS

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Marianny Fernanda Teixeira Pacheco; Bruna Varginha Ramos Caiado; Rafael Dhalia (Responsável)

Projeto de extensão

2015 - 2015 Curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Hematologia Clínica e Laboratorial
Descrição: Monitora do Curso de Pós-Graduação que visa expor conhecimentos da hematologia laboratorial a profissionais da área de saúde.

Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Marianny Fernanda Teixeira Pacheco; Marcos André Cavalcanti Bezerra; Antônio Roberto Lucena de Araújo (Responsável); Pedro Luiz de França Neto; Rodrigo Marcionilo de Santana; Alexsandro Marques da Costa; Thais Helena Chaves Batista

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Genética
3. Virologia

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Português Compreende Bem, Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LIMA, A. S. M.; BEZERRA, M. F.; **PACHECO, M. F. T.**; ARAUJO, A. S.; BEZERRA, M. A. C.; Araújo, A.R.L.

AVALIAÇÃO CLÍNICA DO POLIMORFISMO WT1 RS16754 NO DESFECHO DE PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2018, São Paulo.

HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY. , 2018.

2. **PACHECO, M. F. T.**; LIMA, A. S. M.; BEZERRA, M. F.; FRANCA-NETO, P. L.; COELHO-SILVA, J. L.; BEZERRA, M. A. C.; Araújo, A.R.L.

SCREENING OF TP53 MUTATIONS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA: A SINGLE REFERENCE CENTER STUDY In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2018, São Paulo.

HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY. , 2018. v.40.

3. **PACHECO, M. F. T.**; ALBUQUERQUE, F.P.; BATISTA, T. H. C.; RIBEIRO, M.F.; Araújo, A.R.L. FREQUÊNCIA E IMPACTO CLÍNICO DA MUTAÇÃO JAK2V617F EM PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS In: 50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial, 2016, Rio de Janeiro.

Anais do 50º Congresso da SBPC/ML. 2016.

4. BATISTA, T. H. C.; **PACHECO, M. F. T.**; ALBUQUERQUE, F.P.; ARCANJO, G.S.; BEZERRA, M. A. C.

INFLUENCIA DO GENÓTIPO DO GENE UGT1A1 NA INCIDENCIA DE COLELITÍASE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME In: 50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 2016, Rio de Janeiro.

Anais do 50º Congresso da SBPC/ML. 2016.

5. RIBEIRO, M.F.; MARTINS, D.A.P.; BATISTA, T. H. C.; **PACHECO, M. F. T.**; BEZERRA, M. A. C.

LACK OF ASSOCIATION BETWEEN NOS3 T786C POLYMORPHISM AND ACUTE CHEST SYNDROME DEVELOPMENT IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA In: 50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 2016, Rio de Janeiro.

Anais do 50º Congresso da SBPC/ML. 2016.

6. CAIADO, B. V. R.; SENA, J.; **PACHECO, M. F. T.**; MARQUES, E. T. A.; DHALIA, R.

Characterization of Recombinant Hepatitis A Virus-Like Particles for Diagnosis Kit Development In: XXIV Brazilian Congress of Virology & Mercosur Meeting of Virology, 2013, Porto Seguro.

VIRUS Reviews and Research. Novo Hamburgo: Sociedade Brasileira de Virologia, 2013. v.18. p.1 - 63

7. CAIADO, B. V. R.; **PACHECO, M. F. T.**; DHALIA, R.; LINS, R. D. COMPUTATIONAL DESIGN OF TOP7-BASED MULTI-HCV EPITOPE SCAFFOLDS FOR DIFFERENTIAL HEPATITIS C DIAGNOSIS. In: II USP Conference on Nanotechnology, 2012, Itirapina.

Abstract Book. , 2012. p.1 - 136

8. CAIADO, B. V. R.; SOUSA, R. C. V.; **PACHECO, M. F. T.**; SANTOS, W. S.; MARQUES, E. T. A.; DHALIA, R.

Recombinant Baculovirus system designed to produce Hepatitis A virus-like particles for diagnosis kit development In: XI Reunião Regional Nordeste da SBBq, 2012, Recife.

XI Reunião Regional Nordeste da SBBq. , 2012.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **PACHECO, M. F. T.**; NECO, H. V. P. C.; LORENA, V. M. B.; MORAIS, C. N. L. **ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS NK CITOTÓXICAS E REGULATÓRIAS NA INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DA CÉLULA T HUMANA.**, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)

2. **PACHECO, M. F. T.**; CAIADO, B. V. R.; DHALIA, R. **PRODUÇÃO E VALIDAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DO VÍRUS HIV-1 PARA O DESENVOLVIMENTO DE KITS DE DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DE MICROARRANJOS LÍQUIDOS.**, 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2017. (Congresso)
2. **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2016. (Congresso)
3. **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2015. (Congresso)
4. **Reunião Anual de Iniciação Científica - RAIC**, 2015. (Outra)
5. **Purificação e Aplicações Biotecnológicas de Proteínas**, 2012. (Simpósio)
6. **Reunião anual de iniciação científica - RAIC**, 2012. (Outra)
7. **Reunião regional de bioquímica e biologia molecular - Sbbq**, 2012. (Outra)
8. **XVIII Semana de Biomedicina**, 2011. (Congresso)

Bancas

Bancas

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. **Avaliador Categoria Pôster no IV Congresso Internacional Multiprofissional em Saúde**, 2017, Universidade Federal de Pernambuco