



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ELAINE CRISTINA FONTINELE MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *MMP* AO DESFECHO  
CLÍNICO E ÀS CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS NA  
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Recife  
2019

ELAINE CRISTINA FONTINELE MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *MMP* AO DESFECHO  
CLÍNICO E ÀS CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS NA  
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Área de concentração:** Patologia

**ORIENTADOR:** PROF. DR. JACINTO DA COSTA SILVA NETO

**CO-ORIENTADOR:** PROF. DR. ANTÔNIO ROBERTO LUCENA DE ARAÚJO

Recife  
2019

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M386a Martins, Elaine Cristina Fontinele.  
Associações de polimorfismos no gene *MMP* ao desfecho clínico e às características laboratoriais na leucemia mieloide aguda / Elaine Cristina Fontinele Martins. – 2019.  
56 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2019.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leucemia mieloide aguda. 2. Metaloproteinase da Matriz 2. 3. Metaloproteinase da Matriz 9. 4. rs243865. 5. rs17576. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Título.

616.07            CDD (20. ed.)            UFPE (CCS 2019-300)

ELAINE CRISTINA FONTINELE MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *MMP* AO DESFECHO  
CLÍNICO E ÀS CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS NA  
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em 09/09/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão (Examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Examinador externo)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer (Examinadora externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha querida tia, Elizete Fontinele.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por mais essa graça concedida em minha vida.

À minha família: Sandro, Elizonete, Sandro Filho e Marcelo por todo suporte, por seu amor e paciência que atenuaram meus maus momentos, sempre com muito carinho e otimismo. Amo vocês com a certeza de que nunca encontrarei palavras ou gestos que sejam suficientes para demonstrar a grandeza deste sentimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jacinto Costa, pela oportunidade concedida.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antônio Roberto, que foi fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada pelo conhecimento partilhado e por me inspirar sempre.

Ao Prof. Dr. Marcos André, por sempre me acolher em seu laboratório e incentivar meu crescimento. E por ter despertado em mim o encanto pela hematologia.

Ao meu colega Matheus, agradeço a disponibilidade para me ajudar com as análises estatísticas e na compreensão das mesmas.

Aos meus colegas de turma, agradeço por tornarem a jornada mais leve. Vocês e as nossas risadas compartilhadas estarão sempre no meu coração.

Ao corpo médico, funcionários do laboratório e do arquivo da Fundação HEMOPE e HCP.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia e aos órgãos de fomento que financiaram este projeto: CAPES e CNPq.

## RESUMO

As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas conhecidas por seu papel crítico na metástase, apoptose, proliferação e angiogênese de tumores malignos. Particularmente, MMP2 e MMP9 foram correlacionadas com a invasão celular e progressão tumoral em vários tipos de câncer, como pulmão, mama, cervical e ovário. No entanto, dados sobre a influência das MMPs em tumores não sólidos ainda são escassos. A Leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença de caráter multifatorial e de grande heterogeneidade clínica e biológica; devido a isso existe uma busca crescente por marcadores que ajudem no refinamento do prognóstico dos pacientes. Nesse estudo, investigamos dois polimorfismos de base única no gene *MMP* em pacientes com LMA, associando estes achados às características laboratoriais, sobrevida global (SG), sobrevida livre de doença (SLD) e taxa de remissão completa (RC). 88 pacientes adultos diagnosticados com LMA foram incluídos em nosso estudo; destes todos foram genotipados para o polimorfismo *MMP2* C>T (rs243865) e 85 foram genotipados para o polimorfismo *MMP9* A>G (rs17576). As frequências observadas para o *MMP2* foram: 67% C/C, 29,5% C/T e 3,4% T/T; para o *MMP9* as frequências foram 37,5% A/A, 47,7% A/G e 11,4% G/G. O polimorfismo do gene *MMP9* mostrou diferença estatística ( $p= 0,039$ ) na sobrevida livre de doença quando comparamos pacientes heterozigotos A/G e homozigotos variantes G/G aos pacientes homozigotos selvagens A/A, indicando que esses pacientes tem pior prognóstico. Para o polimorfismo do gene *MMP2*, o alelo homozigoto selvagem C/C pode estar associado ao desenvolvimento da LMA em indivíduos mais jovens ( $p=0,030$ ). Nas demais variáveis analisadas, os polimorfismos estudados não parecem ter relevância na LMA.

Palavras-chave: Leucemia mieloide aguda. Metaloproteinase da Matriz 2. Metaloproteinase da Matriz 9. rs243865. rs17576.

## ABSTRACT

Matrix Metalloproteinases (MMPs) are well known for their critical role in metastasis, apoptosis, proliferation and angiogenesis of malignant tumors. Particularly, MMP2 and MMP9 were correlated with cell invasion and tumor progression in various cancers such as lung, breast, cervical and ovarian. However, data on the influence of MMPs on non-solid tumors are still scarce. Acute Myeloid Leukemia (AML) is a multifactorial disease of great clinical and biological heterogeneity. Due to this, there is a growing search for markers that help to improve the prognosis of patients. In this study, we investigated two single-base polymorphisms in the *MMP* gene in AML patients, associating these findings with laboratory characteristics, overall survival (OS), disease free survival (DFS), and complete remission achievement (CR). 88 adult patients diagnosed with AML were included in our study; of these all were genotyped for the *MMP2* C> T polymorphism (rs243865) and 85 were genotyped for the *MMP9* A> G polymorphism (rs17576). The frequencies observed for *MMP2* were: 67% C/C, 29.5% C/T and 3.4% T/T; for *MMP9* the frequencies were 37.5% A/A, 47.7% A/G and 11.4% G/G. *MMP9* gene polymorphism showed statistical difference ( $p= 0.039$ ) in disease free survival when comparing A/G heterozygous and G/G variant homozygous patients to wild A/A homozygous patients, indicating that these patients have a worse prognosis. For *MMP2* gene polymorphism, the wild homozygous C/C allele may be associated with the development of AML in younger individuals ( $p=0.030$ ). In the other variables analyzed, the polymorphisms studied do not seem to have relevance in AML.

Keywords: Acute myeloid leukemia. Matrix Metalloproteinase 2. Matrix Metalloproteinase 9. rs243865. rs17576.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Localização cromossômica do gene *MMP2* (Adaptado de <https://ghr.nlm.nih.gov/>). ..... 20
- Figura 2** - Localização cromossômica do gene *MMP9* (Adaptado de <https://ghr.nlm.nih.gov/>). ..... 20
- Figura 3** - Presença de blastos no sangue periférico. Quadro frequentemente observado em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA). Fonte: arquivo pessoal. Imagem obtida no Laboratório Central, Centro de Ciências Biológicas, UFPE. .... 24
- Figura 4** - **(a)** Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda frente ao polimorfismo do gene *MMP2*.  
**(b)** Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda frente ao polimorfismo do gene *MMP2*. ..... 41
- Figura 5** - **(a)** Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda frente ao polimorfismo do gene *MMP9*.  
**(b)** Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda frente ao polimorfismo do gene *MMP9*. ..... 42

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Classificação para a LMA pela OMS em 2008. .... **26**
- Quadro 2** - Estratificação de risco sugerida pelo grupo LeukemiaNet.  
\*Definido como três ou mais alterações cromossômicas na ausência de uma das translocações ou inversões recorrentes designados pela OMS, isto é, t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) ou t(3;3). Fonte: Adaptado de Dohner *et al.*, 2010. .... **29**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais MMPs e seus substratos. Adaptado de Brauer, 2006. ....	<b>18</b>
<b>Tabela 2</b> - Características clínico-laboratoriais – <i>MMP2</i> .....	<b>37</b>
<b>Tabela 3</b> - Características clínico-laboratoriais – <i>MMP9</i> .....	<b>38</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CN	Cariótipo normal
CNS	Conselho Nacional de Saúde
FAB	French-American-British
Hb	Hemoglobina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LABCEN	Laboratório Central
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MO	Medula óssea
NHCL	Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial
OMS	Organização mundial de saúde
PCR-RT	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
RC	Taxa de remissão completa
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SP	Sangue Periférico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>MATRIZ EXTRACELULAR</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Metaloproteinases de Matriz</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Gelatinases: MMP2 e MMP9</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Os Genes <i>MMP2</i> e <i>MMP9</i></b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Polimorfismos no <i>MMP2</i> e <i>MMP9</i></b> .....	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Fisiopatologia da LMA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Diagnóstico e classificação da LMA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Fatores prognósticos na LMA</b> .....	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>CASUÍSTICA</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3.</b>	<b>VARIÁVEIS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CLÍNICA</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Coleta de dados e amostras</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Diagnóstico de LMA</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Desfecho</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5</b>	<b>ESTUDO MOLECULAR</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Extração do DNA genômico</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Análise Molecular dos Polimorfismos</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Análises Estatísticas</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b><i>MMP2</i></b> .....	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b><i>MMP9</i></b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>

<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ..53</b>
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas que digerem diferentes componentes da matriz extracelular (MEC). Através da degradação da MEC, as MMPs participam de muitos processos fisiológicos e patológicos, como embriogênese, cicatrização de feridas, inflamação e carcinogênese, função esta que vem sendo amplamente estudada. No entanto, o papel das MMPs na carcinogênese não se limita à degradação da MEC; elas também são capazes de regular vias de sinalização em células normais e cancerosas, além de regular a proliferação de células cancerígenas pela clivagem de precursores de determinados fatores de crescimento. Entre as MMPs, as gelatinases (MMP2 e MMP9) tem sido alvo de muitos trabalhos por sua capacidade de degradação da MEC devido à sua especificidade de substrato em relação ao colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal. MMP2 e MMP9 vem sendo associadas a um pior prognóstico em diversos tipos de tumores malignos, como o câncer cervical, gástrico, de pulmão, de mama e de próstata.

As MMPs são moduladas por diversos polimorfismos, dentre eles os polimorfismos dos genes *MMP2* C>T (rs243865) e *MMP9* A>G (rs17576) tem se destacado por seu envolvimento na suscetibilidade e agravamento de diversos tipos de câncer como colorretal, de mama, próstata, pulmão, entre outros. Entretanto, seu papel nas neoplasias hematológicas, incluindo a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) ainda não está bem estabelecido.

A LMA constitui um grupo heterogêneo de neoplasias malignas do tecido hematopoiético e se caracteriza pela proliferação descontrolada de células blásticas na medula óssea. Os blastos leucêmicos não conseguem passar pelo processo normal de maturação, sendo liberados no sangue periférico ainda indiferenciados e, portanto, disfuncionais. Os principais sintomas da doença, como fadiga, palidez, infecções recorrentes, petéquias, epistaxe, hepatoesplenomegalia e cefaleia, ocorrem em decorrência da anemia, neutropenia e trombocitopenia resultantes da carência de células efetivas e da invasão de órgãos como o baço, fígado e cérebro pelas células malignas.

A subclassificação da LMA é de grande importância para estabelecimento do prognóstico e escolha terapêutica. Por sua etiopatogenia multifatorial, que engloba fatores ambientais (como exposição a genotóxicos), genéticos (como mutações, polimorfismos e aberrações cromossômicas) e epigenéticos (como metilação de DNA e acetilação de histonas), existe uma busca crescente por marcadores que auxiliem no refinamento prognóstico e entendimento da biologia da doença.

Este trabalho estudou os polimorfismos dos genes *MMP2* C>T (rs243865) e *MMP9* A>G (rs17576) e suas possíveis influências nas características laboratoriais da LMA, bem como em seu prognóstico e desfecho clínico. Tais associações podem contribuir com a literatura enriquecendo o conhecimento acerca desses genes e sua relação com a LMA.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura tridimensional, que está presente nos tecidos e é essencial para a vida. Cada órgão tem uma MEC com composição única que surge no início do estágio embrionário. A função da MEC vai além do fornecimento de suporte físico para a integridade e elasticidade do tecido: é uma estrutura dinâmica que é constantemente remodelada para controlar a homeostase dos tecidos (HYNES et al., 2009). A importância funcional da MEC é ilustrada pela vasta gama de defeitos teciduais ou, em casos graves, a letalidade embrionária causada por mutações nos genes que codificam componentes da MEC. Os estudos de perda de função também mostraram a importância das proteínas da MEC nos processos de desenvolvimento, uma vez que a deleção genética de proteínas específicas da MEC, como a fibronectina e os colágenos, são frequentemente embrionárias letais (ROZARIO et al., 2010).

Em mamíferos, a MEC é composta por até 300 proteínas, como colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas (HYNES et al., 2009). Existem dois tipos principais de MEC que diferem em relação à sua localização e composição: o tecido conjuntivo intersticial, que envolve as células e fornece andaimes estruturais para tecidos; e a membrana basal, que é uma forma especializada de MEC que separa o epitélio do estroma circundante (BONNANS et al., 2014). Na maioria dos órgãos, os principais componentes da MEC são diferentes tipos de colágeno e numerosas outras proteínas, incluindo laminina, fibronectina, vitronectina e proteoglicanos (ROY et al., 2009).

Esses componentes da MEC interagem constantemente com as células epiteliais, servindo como ligantes para receptores celulares como as integrinas, transmitindo sinais que regulam a adesão, a migração, a proliferação, a apoptose, a sobrevivência ou a diferenciação. A MEC também pode sequestrar e liberar localmente fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e outras moléculas de sinalização. Os componentes da MEC liberados através de clivagem da MEC também regulam a arquitetura da MEC e influenciam o comportamento celular (HYNES et al., 2009). Esses processos são complexos e precisam ser rigorosamente regulados para manter

a homeostase do tecido, especialmente em resposta à lesão; pois a desregulação da remodelação da MEC está associada a condições patológicas e pode exacerbar a progressão de doenças.

A clivagem dos componentes da MEC é o principal processo durante a sua remodelação e é importante para a regulação da abundância, composição e estrutura da MEC, bem como para a liberação de moléculas biologicamente ativas (tais como os fatores de crescimento); e ainda, a degradação da MEC é o evento-chave para invasão e metástase. A MEC pode ser clivada por diferentes famílias de proteases; e as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) são as principais enzimas envolvidas nesse processo (BONNANS et al., 2014).

### **2.1.2 Metaloproteinases de Matriz**

As metaloproteinases de matriz (MMPs) representam uma importante família de proteínas composta por aproximadamente 24 enzimas extracelulares que apresentam similaridades nos domínios estruturais, funcionais e mecanismos de ativação. As MMPs humanas são divididas em subgrupos de acordo com a sua homologia, baseados na sua estrutura e no seu substrato específico (Tabela 1). As MMPs são responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular, incluindo membrana basal, colágeno, fibronectina e várias proteoglicanas que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos como embriogênese e remodelamento tecidual (NELSON et al., 2000); podem ainda influenciar funções celulares básicas, tais como: proliferação, migração, diferenciação e apoptose, através da regulação de proteínas da MEC com as quais as células interagem (PAGE-MCCAW et al., 2007).

Um mecanismo de controle dessas enzimas é através dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), todas as MMPs podem ser inativadas por um tipo específico de TIMP (DOCHERTY et al., 1985; BONNANS et al., 2014).

Várias MMPs foram implicadas na degradação da MEC e associadas ao crescimento tumoral e à angiogênese. Sua atividade proteolítica é necessária para que uma célula cancerígena invada um vaso sanguíneo próximo (intravasamento) e em seguida, extravase usando mecanismo semelhante num local distante e crie um novo local metastático (ROY et al., 2009).

**Tabela 1.** Principais MMPs e seus substratos. Adaptado de Brauer, 2006.

Grupo	Principais substratos da ME
<b>Colagenases</b>	
MMP-1	Colágenos I, II, III, VII e X e agrecan
MMP-8	Colágenos I, II e III
MMP-13	Colágenos I, II, III, VI e X, agrecan, fibronectina e laminina
<b>Gelatinases</b>	
MMP-2	Colágenos I, IV, V, VI, VII, X e XI, fibronectina, laminina e vitronectina
MMP-9	Colágenos I, IV, V, VI, X e XI, elastina, agrecan, fibronectina e vitronectina
<b>Matrilisina</b>	
MMP-7	Colágenos III, IV, IX, X e XI, elastina, fibrina, laminina, fibronectina e vitronectina
<b>Estromelisinases</b>	
MMP-3	Colágenos III, IV, V, VI, IX, X e XI, pró-MMP-1, -3, -7, -9, -13, fibronectina, laminina e proteoglicanos
MMP-10	Colágenos III, IV, V e XI, fibronectina, laminina e proteoglicanos
MMP-11	Colágeno IV, fibronectina e laminina

Entre as MMPs, as gelatinases (MMP2 e MMP9) são fundamentais para a degradação da MEC devido à sua especificidade de substrato em relação ao colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal (HUA et al., 2011); além disso, elas ajudam as células tumorais a entrar na circulação e também podem apoiar o seu extravasamento e metástase (PACKARD et al., 2009; KESSENBROCK et al., 2010). Por suas propriedades, MMP2 e MMP9 tem sido amplamente estudadas como potenciais marcadores de câncer.

### 2.1.3 Gelatinases: MMP2 e MMP9

As gelatinases incluem a família de genes *MMP2* (gelatinase A) e *MMP9* (gelatinase B). A gelatinase A e a gelatinase B são dois membros estreitamente relacionados da família das MMPs que degradam eficientemente colágenos ou gelatinas desnaturadas e uma série de moléculas da MEC, incluindo colágenos tipo IV, V e XI, laminina e proteína do núcleo aggrecan (VAN DEN STEEN et al., 2002). A MMP2 digere ainda os colágenos I, II e III de maneira semelhante às colagenases (PATTERSON et al., 2001).

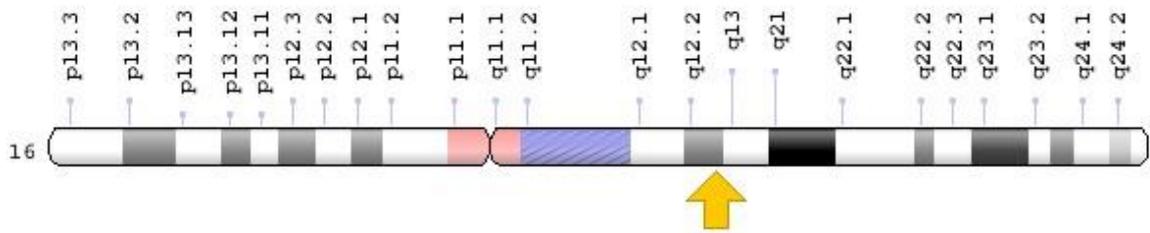
MMP2 e MMP9 vem sendo associadas a um pior prognóstico em diversos tipos de câncer. No câncer cervical, estudos mostram que a elevada expressão de MMP9 está associada à invasão estromal, metástase linfonodal e invasão vascular (LI et al., 2012; DONGMEI et al., 2016). MMP9 mostrou-se ainda envolvida em invasividade e metástase também em câncer renal (WU et al., 2014) e osteossarcoma (TSURU et al., 2015). Em tumores gástricos, as atividades de MMP2 e MMP9 correlacionam-se positivamente com metástases (BURLAKA et al., 2016); resultado similar foi encontrado no câncer de pulmão (PARK et al., 2010; HUNG et al., 2010; XU et al., 2012). No câncer de mama, níveis elevados de expressão das gelatinases estão associados à metástase óssea (OHSHIBA et al., 2003; LIU et al., 2016); e a atividade e a expressão da MMP2 estão aumentadas em metástases cerebrais (MENDES et al., 2007).

Através desses relatos, é possível observar que a MMP2 e a MMP9 tem importantes implicações na progressão e invasividade de muitos distúrbios malignos. Em contraste, estudos sobre o significado biológico dessas moléculas em leucemias ainda é escasso na literatura.

### 2.1.4 Os Genes *MMP2* e *MMP9*

O gene *MMP2* está localizado na região 16q12.2 (Figura 1) e codifica a proteína metaloproteinase de matriz – tipo 2, uma gelatinase de 72kDa capaz de degradar colágeno tipo IV, V, VII e X e também fibronectina e laminina. O gene possui 17kb de comprimento distribuídos em 13 éxons que variam de 110 a 901pb (HUHTALA et al., 1990).

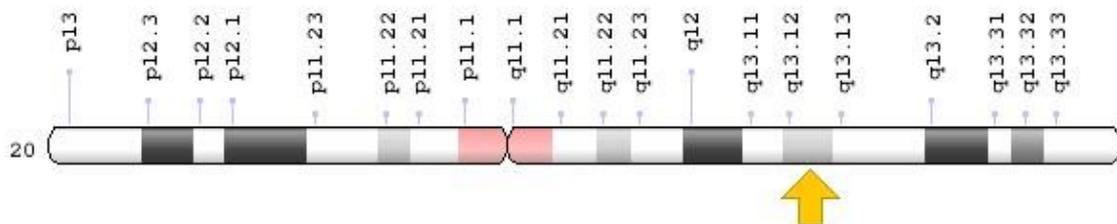
Figura 1: Localização cromossômica do gene **MMP2**



Fonte: Adaptado de <https://ghr.nlm.nih.gov/>.

O gene **MMP9** está localizado na região 20q13.12 (Figura 2) e codifica a metaloproteinase do tipo 9, uma gelatinase de 92 kDa, responsável por degradar colágeno tipo IV e V e fibronectina. O gene possui 13 éxons (HUHTALA et al., 1991).

Figura 2: Localização cromossômica do gene **MMP9**



Fonte: Adaptado de <https://ghr.nlm.nih.gov/>.

As MMPs são moduladas por diferentes polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Dentre eles, *MMP2* (-1306 C>T) e *MMP9* (-1562 A>G), tem demonstrado ter mais significado clínico.

### 2.1.5 Polimorfismos no *MMP2* e *MMP9*

Polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles. Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (loci) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo, e menor que 1%

considera-se mutação (COLLINS et al., 1998). Geralmente os polimorfismos são alterações mais amenas, que alteram sem comprometer completamente a função da proteína, enquanto que as mutações tendem a ter efeitos mais perceptíveis na proteína e no fenótipo. Os polimorfismos podem consistir em deleções, inserções ou SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*), onde há troca de apenas um único nucleotídeo (WHIBLEY et al., 2009).

Diferentes polimorfismos foram descritos no gene MMP2. Uma destas alterações é uma mudança de citosina para timina (C/T) na posição -1306 (rs243865) localizada na região promotora do gene, levando a diminuição da atividade do promotor e da expressão gênica. (PRICE et al., 2001; XU et al., 2004). Estudos correlacionaram esse polimorfismo a um pior prognóstico em diversos tipos de câncer como pulmão (YU et al., 2002), gástrico (MIAO et al., 2003), colorretal (XU et al., 2004), mama (ZHOU et al., 2011) e próstata (WHEN et al., 2017)

No gene *MMP9*, um polimorfismo que vem sendo bem estudado é o que determina uma alteração encontrada na região codificante do gene 836 A/G, no éxon 6 (rs17576), resultando numa modificação na sequência de aminoácido (Gln279Arg) e pode alterar a capacidade de ligação da enzima com seu substrato. A variação citada (rs17576) tem sido estudada em alguns tipos de câncer como pulmão e mama (WU et al., 2008), próstata (DOS REIS et al., 2009), gástrico (OKADA et al., 2017) e mesotelioma (SU et al., 2017).

Apesar das evidências da influência desses polimorfismos em tumores sólidos, a literatura acerca das neoplasias hematológicas ainda é insuficiente e contraditória, sendo necessária a realização de estudos com maior número de casos (WHIBLEY et al., 2009).

## 2.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A leucemia mieloide aguda (LMA) constitui um grupo heterogêneo de neoplasias malignas da medula óssea que afetam progenitores hematopoiéticos, tornando-os incapazes de se diferenciarem e de responderem aos reguladores naturais de proliferação e morte celular. Como consequência, essas células malignas

(mieloblastos) se acumulam na medula óssea e prejudicam a produção normal das células sanguíneas. A perda de função e substituição das células normais da medula óssea resulta em anemia, trombocitopenia e diminuição da contagem de leucócitos funcionais, resultando em sintomas característicos como: fraqueza, aparecimento de petéquias, sangramentos, maior susceptibilidade às infecções e dor óssea (DÖHNER et al., 2010). Além disso, os mieloblastos também podem se acumular em outros tecidos e órgãos (como fígado, baço e gengiva), cujas funções são frequentemente comprometidas (LOWENBERG et al., 1999; ESTEY e DÖHNER et al., 2006). A LMA representa o tipo mais comum de leucemia aguda em adultos, correspondendo a cerca de 90% dos casos (DORES et al., 2011).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para 2018-2019, 10.800 novos casos de leucemias agudas no Brasil. A incidência de LMA no país ainda é desconhecida, uma vez que o INCA relata apenas dados referentes às leucemias em geral (INCA, 2019). Apesar de rara, quando comparada a outros cânceres, a LMA tem uma evolução rápida, silenciosa e apresenta uma alta taxa de letalidade, constituindo um problema de saúde pública.

No Brasil, a sobrevida global estimada em cinco anos está em torno de 20% (PAGNANO et al., 2000; REGO et al., 2002; CAPRA et al., 2007), enquanto que em países desenvolvidos, oscila em torno de 40% (MOORE et al., 2005; PETERSDORF et al., 2007; BURNETT et al., 2011). Essa discrepância possui razões multifatoriais, e a falha no tratamento de pacientes com LMA está mais relacionada com fatores socioeconômicos e questões relacionadas a políticas públicas de saúde, do que à doença em si. No Brasil, o tratamento de pacientes com LMA é dificultado pelo atraso no início da quimioterapia de indução (devido ao atraso no diagnóstico), indisponibilidade de medicamentos e falta de infraestrutura adequada para quimioterapia e/ ou transplante de células tronco, que tem por consequência, a alta incidência de infecções bacterianas e fúngicas. Para complicar ainda mais este cenário, análises citogenéticas e moleculares, que tem importância incontestável, ainda não são uma prática rotineira para a maioria dos centros de referência do Brasil, e sua realização é praticamente limitada aos centros de pesquisa de universidades. Essa incompleta classificação da doença é um dos fatores para o grande número de desfechos clínicos desfavoráveis no país, visto que um tratamento não direcionado é quase sempre fatal (PAGNANO et al., 2000; REGO et al., 2002; CAPRA et al., 2007).

### 2.2.1 Fisiopatologia da LMA

Durante os últimos anos, houve um progresso notório na busca da elucidação da patogênese molecular da LMA. É uma doença que está associada à ocorrência de alterações citogenéticas, mutações somáticas recorrentes, mudanças na expressão gênica e na regulação epigenética (SANDERS e VALK et al., 2013). Acredita-se que a leucemogênese esteja associada ao acúmulo de modificações gênicas que conferem ao clone leucêmico vantagem proliferativa e perda da capacidade de resposta a sinais de diferenciação e morte celular (CONWAY et al., 2014).

GILLILAND et al., em 2002, apresentaram um modelo para explicar a patogênese da LMA, o chamado “*two hit*”. De acordo com o modelo proposto, o desenvolvimento da LMA é considerado um processo multipasso que requer a colaboração de ao menos duas classes de mutações. Mutações de classe I são aquelas envolvidas na desregulação da proliferação celular, evasão da apoptose, ativação constitutiva de receptores ou desregulação de moléculas das vias de transdução de sinal. Enquanto que mutações de classe II compreendem as translocações cromossômicas e afetam fatores de transcrição e proteínas envolvidas no controle transcricional, estando associadas com a perda da capacidade de diferenciação hematopoiética. Mutações que afetam os genes *FLT3*, *KIT* e o gene *RAS* são consideradas mutações de classe I, enquanto que alterações cromossômicas como t(8;21), inv(16) e t(15;17) que geram, respectivamente, os rearranjos gênicos AML1/ETO, CBFβ/MYH11 e PML/RARA, juntamente com as mutações nos genes *RUNX1*, *CEBPA* e *MLL* são consideradas integrantes da classe II. De acordo com esse modelo, o acúmulo de mutações de classe I e II culminaria no desenvolvimento de progenitores hematopoéticos transformados, capazes de propagar o fenótipo leucêmico.

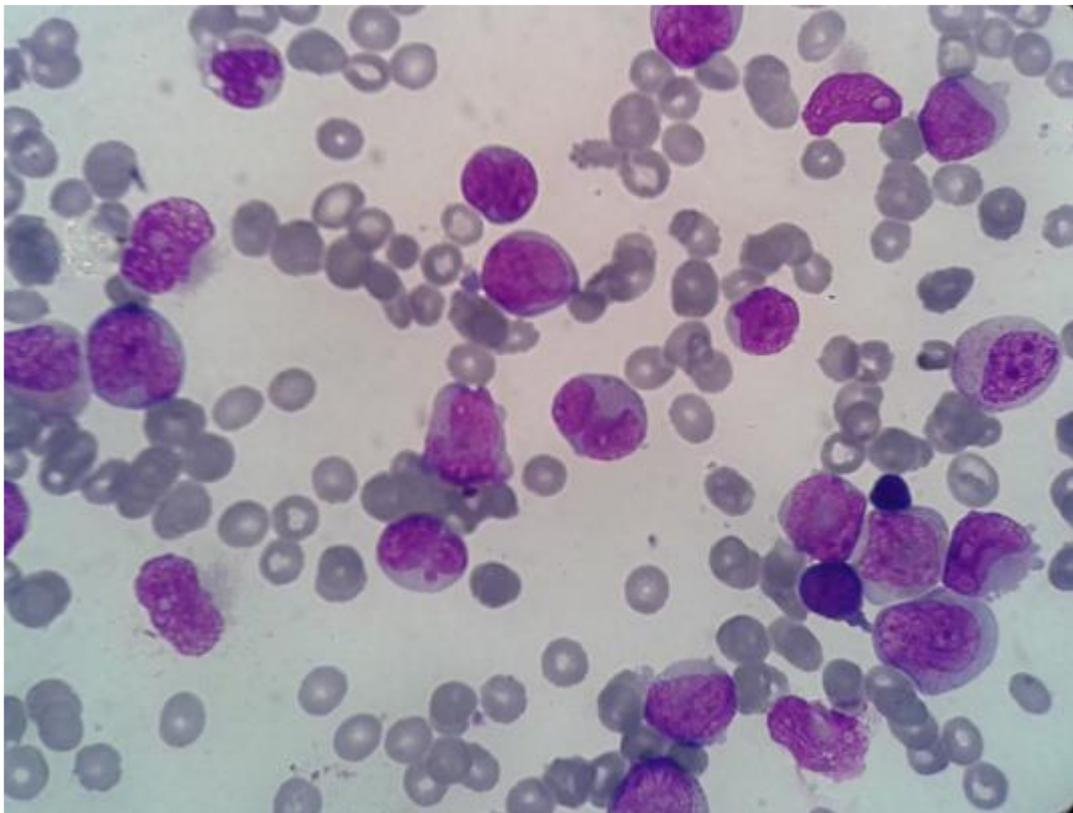
### 2.2.2 Diagnóstico e classificação da LMA

O diagnóstico da LMA é feito a partir da observação do quadro clínico, caracterizado por fraqueza generalizada devido à anemia, febre em consequência de infecções ou não, petéquias e/ou outras manifestações hemorrágicas. Devido à intensa e descontrolada proliferação dos blastos, pode haver infiltração leucêmica em órgãos diversos, causando hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia gengival, dor

óssea, infiltração cutânea e comprometimento do sistema nervoso central (DÖHNER et al., 2010).

O principal critério diagnóstico é o percentual mínimo de 20% de blastos na medula óssea e/ou no sangue periférico (Figura 3). Ao hemograma, apresenta-se mais comumente como uma anemia normocítica/normocrômica, sendo comum a presença de policromasia e até de eritroblastos circulantes, acompanhada de plaquetopenia e neutropenia. A contagem de leucócitos pode variar entre baixa, normal ou elevada e o percentual de blastos frequentemente está acima de 20%, mas também podem estar ausentes no sangue periférico (HOFFBRAND, 2008). No mielograma, observa-se infiltração medular por blastos leucêmicos, com redução na quantidade de células de outras linhagens, podendo ainda haver displasia. Também é comum haver alterações hemostásicas; o consumo de fatores de coagulação causa o alargamento do tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada, redução do fibrinogênio e aumento do D-dímero. Outro achado frequente é o aumento sérico da enzima lactato desidrogenase (ZAGO, 2013).

**Figura 3.** Presença de blastos no sangue periférico. Quadro frequentemente observado em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA).



Fonte: arquivo pessoal. Imagem obtida no Laboratório Central, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

A heterogeneidade da LMA motivou o estabelecimento de uma classificação e estratificação de risco (BULLINGER et al. 2010). A primeira classificação foi realizada em 1976 pelo grupo cooperativo Franco-Americano Britânico (FAB) baseada estritamente nos aspectos morfológicos e citoquímicos do clone leucêmico e assim, categorizou seis subtipos de LMA (M1 a M6) (BENNETT et al., 1976). Em 1985 essa classificação foi revisada, resultando na inclusão de dois novos subtipos (M0 e M7) aos seis existentes, cujo diagnóstico também passou a levar em consideração os marcadores imunofenotípicos (BENNETT et al., 1985, 1991). Apesar da sua relevância, a classificação FAB tornou-se obsoleta devido ao fato de não incorporar os achados citogenéticos e moleculares relevantes à fisiopatologia da doença, estando limitada no que concerne à biologia, determinação prognóstica e terapêutica.

Baseando-se nestes novos conhecimentos, a OMS criou em 2001, com revisão em 2008, uma nova classificação, contemplando as características citogenéticas e moleculares da LMA, Quadro 1 (VARDIMAN, 2009).

Quadro 1. **Classificação para a LMA pela OMS em 2008.**

---

*LMA com anormalidades genéticas repetitivas*

- LMA com t(8;21)(q22;q22); (*RUNX1-RUNX1T1*)
- LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16) (p13.1;q22); (*CBFB-MYH11*)
- Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); (*PML-RARA*)
- LMA com t(6;9)(p23;q34); (*DEK-NUP214*)
- LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2); (*RPN1-EVI1*)
- LMA com t(1;22)(p13;q13); (*RBM15-MKL1*)
- Subtipo provisório: LMA com mutação *NPM1*
- Subtipo provisório: LMA com mutação *CEBPA*

*LMA relacionada com mudanças mielodisplásicas*

*Neoplasma mielóide relacionado à terapia*

*LMA não categorizado nos itens anteriores*

- LMA com diferenciação mínima
- LMA sem maturação
- LMA com maturação
- Leucemia mielomonocítica aguda
- Leucemia monoblástica e monocítica aguda
- Leucemias eritróides agudas
  - Leucemia eritróide pura
  - Eritroleucemia, mielóide/eritróide
- Leucemia megacarioblástica aguda
- Leucemia basofílica aguda
- Pan-mielose aguda com mielofibrose

*Sarcoma mielóide*

*Proliferação mielóide relacionada à Síndrome de Down*

- Mielopoesse anormal transitória
- Leucemia mielóide associada com a Síndrome de Down

---

Fonte: Adaptado de Vardiman, 2009.

### 2.2.3 Fatores prognósticos na LMA

Os fatores prognósticos podem ser subdivididos entre aqueles relacionados à condição de saúde geral do paciente e aqueles relacionados às características da leucemia. Os fatores do primeiro grupo são particularmente relevantes na predição da mortalidade relacionada ao tratamento e torna-se mais importante com o aumento da

idade do paciente, enquanto que os do segundo grupo são preditivos da resistência à terapia convencional (DOHNER et al., 2010).

Entre os fatores relacionados à condição de saúde geral do paciente, a idade tem sido descrita como o fator preditor mais importante. Pacientes idosos apresentam uma incidência maior de outros fatores de pior prognóstico, tais como a ocorrência simultânea de comorbidades, maior frequência de alterações citogenéticas de alto risco e leucemia secundária (APPELBAUM et al., 2006; JULIUSSON et al., 2009). Em virtude disso, o prognóstico tende a piorar com o aumento da idade muitas vezes a despeito de outros fatores importantes, como citogenética, genética molecular ou subtipo de LMA. Os fatores prognósticos relacionados à LMA incluem a leucometria, origem da leucemia (de novo ou secundária). A hiperleucocitose (contagem de leucócitos superior a  $100 \times 10^9/L$  no sangue periférico) tem sido associada a um prognóstico desfavorável devido a elevada morte precoce e ao alto risco de recaída (GREENWOOD et al., 2006).

Alterações citogenéticas estruturais ou numéricas foram identificadas e de acordo com os achados citogenéticos, três grupos prognósticos foram definidos: 1. prognóstico favorável, que inclui a  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13;q22)$ ,  $t(16;16)(p13;q22)$  ou  $t(15;17)(q22;q12)$ ; 2. prognóstico adverso, que inclui  $inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26)$ , translocações balanceadas envolvendo 11q23,  $t(6;9)(p23;q34)$ ,  $t(1;22)(p13;q13)$  e cariótipo complexo; 3. prognóstico intermediário, que inclui pacientes com cariótipo normal (LMA-CN) e portadores de alguma anormalidade citogenética não enquadrada nas demais categorias (VARDIMAN et al., 2009).

No grupo favorável é importante destacar a  $t(15;17)(q22;q12)$ , correspondente à Leucemia Promielocítica Aguda (LPA). Subtipo anteriormente definido como M3 e M3 variante pela classificação FAB, a LPA corresponde a 5-8% dos casos de LMA em países desenvolvidos e a 15-20% dos casos em pacientes latino-americanos. A LPA tem características bastante peculiares como a morfologia dos blastos, a elevada frequência de alterações da coagulação, e a excelente resposta à combinação do ácido *all* trans retinóico e antracíclicos ou ao trióxido de arsênico. Pacientes que sobrevivem às primeiras semanas de tratamento tem bom prognóstico, taxas de

remissão completa de até 80% em pacientes com idade entre 18 e 60 anos e sobrevida global por longo prazo superior a 70% (ZAGO, 2013).

O grupo de LMA-CN corresponde a 40 a 50% dos casos de LMA e apresenta um prognóstico consideravelmente variável, visto que as alterações que causam a clonalidade não são grandes alterações cromossômicas, não podendo, portanto, serem esclarecidas através da citogenética (GRIMWADE et al., 2010). Várias mutações foram descritas nesse grupo e apresentam impacto no prognóstico desses pacientes, dentre elas, as mais bem estudadas são as mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* (ANDERSSON et al., 2004; MROZEC et al., 2007; ROCKOVA et al., 2011; VELLOSO et al., 2011).

A LMA associada a mutações no gene *NPM1* é a alteração gênica mais comum nas LMAs, sendo detectadas em 30-35% dos adultos. É comum que os pacientes portadores de mutações no gene *NPM1* também sejam portadores de mutações do tipo duplicações internas em tandem no gene *FLT3* (*FLT3-ITD*). Do ponto de vista prognóstico, os pacientes com mutações no *NPM1* e sem mutações no *FLT3* possuem prognóstico favorável. As mutações no *CEBPA* ocorrem em aproximadamente 5-10% dos casos de LMA de novo. Na ausência da coexistência de mutações no gene *FLT3* (*FLT3-ITD*), as mutações no *CEBPA* estão associadas a bom prognóstico, com 60% dos pacientes sobrevivendo a longo prazo (ZAGO, 2013).

Diante da importância das mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* para o prognóstico dos pacientes LMA-CN, o grupo European Leukemia Net, em 2010 (Quadro 2), propôs uma estratificação que levava em consideração o prognóstico conferido por seus cariótipos e, nos casos de LMA-CN, pela associação destes aos marcadores moleculares. O refinamento da estratificação do prognóstico dos pacientes de cariótipo normal é particularmente importante devido ao fato de representarem cerca de 40-50% dos casos, e de sua responsividade à terapia ser caracteristicamente heterogênea (SEHGAL et al., 2014).

Quadro 2. Estratificação de risco sugerida pelo grupo LeukemiaNet. \*Definido como três ou mais alterações cromossômicas na ausência de uma das translocações ou inversões recorrentes designados pela OMS, isto é, t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) ou t(3;3).

<b>Grupo genético</b>	<b>Subtipo</b>
Favorável	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal) <i>CEBPA</i> mutado (cariótipo normal)
Intermediário I	Outros cariótipos normais não especificados no grupo favorável
Intermediário II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranjado -5 ou del(5q); -7; abnl(17p); cariótipo complexo*

Fonte: Adaptado de Dohner *et al.*, 2010.

Apesar da grande quantidade de dados sobre alterações moleculares na LMA, as investigações continuam em ritmo acelerado, em busca de inovações no diagnóstico, estabelecimento do prognóstico e terapêutica e maior conhecimento sobre a biologia da doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto clínico dos polimorfismos nos genes *MMP2* C>T (rs243865) e *MMP9* A>G (rs17576) na Leucemia Mieloide Aguda.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as frequências genóticas resultantes dos polimorfismos nos genes *MMP2* C>T (rs243865) e *MMP9* A>G (rs17576) em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda.
2. Determinar o impacto clínico e laboratorial dos polimorfismos nos genes *MMP2* C>T (rs243865) e *MMP9* A>G (rs17576), quanto aos desfechos de sobrevida global, sobrevida livre de doença e taxa de remissão completa em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda.

## **4 MATERIAIS 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 I). 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 II). A fundação de Hematologia de Pernambuco (HEMOPE) e o Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) foram incluídas no presente trabalho como instituições co-participantes, uma vez que suas colaborações permitiram a obtenção dos pacientes.

### **4.2 CASUÍSTICA**

O estudo é do tipo coorte com comparação de grupos internos, realizado no Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas (NHCL LabCen/ CCB/ UFPE). Todos os pacientes incluídos no presente estudo foram diagnosticados e tratados no Hospital de Hematologia da Fundação (HEMOPE) ou no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP), no período de janeiro de 2010 a julho 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 à 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 LPA também foram excluídos das análises.

### 4.3 VARIÁVEIS

As variáveis analisadas ao diagnóstico foram: idade; sexo; subtipo de LMA com base em critérios FAB e OMS; dados do hemograma (leucometria, contagem de plaquetas e níveis de hemoglobina); achados citogenéticos ao diagnóstico; mutações ITD do gene *FLT3* e mutações no gene *NPM1*. Para a análise de sobrevida foram avaliadas a sobrevida global (SG), a sobrevida livre de doença (SLD) e a taxa de remissão completa (RC).

### 4.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CLÍNICA

#### 4.4.1 Coleta de dados e amostras

O material utilizado na pesquisa foi o mesmo encaminhado aos laboratórios de rotina para fins diagnósticos, não sendo necessária coleta adicional nos pacientes. Foi utilizado o material proveniente do sangue periférico (SP) ou do aspirado de medula óssea (MO) anticoagulados em EDTA. Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram obtidos por meio da análise de prontuário, sempre levando em consideração os resultados ao diagnóstico.

#### 4.4.2 Diagnóstico de LMA

O diagnóstico da doença foi estabelecido com base em achados clínicos e laboratoriais de acordo com critérios estipulados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Vardiman et al., 2009). 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.

#### 4.4.3 Desfecho

Os pacientes vivos foram censurados em julho de 2018 e, os demais cujo seguimento foi perdido e/ou foram 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.

## **4.5 ESTUDO MOLECULAR**

### **4.5.1. Extração do DNA genômico**

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (DAVIS et al. 1986).

O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, o plasma descartado e os eritrócitos lisados com uma mistura de soluções contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M e após centrifugação o sobrenadante foi desprezado. A seguir, a solução denominada TKM1 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 100 $\mu\text{l}$  de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400 $\mu\text{l}$  da solução TKM2 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25  $\mu\text{l}$  de SDS 10% e incubado a 55°C durante 30 minutos. Após esse período, 180 $\mu\text{l}$  de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se a ele, um volume igual de fenol e de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. A mistura de clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada ao tubo, centrifugada e o sobrenadante foi

transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

#### 4.5.2 Análise Molecular dos Polimorfismos

Foram selecionados para este estudo, dois SNPs localizados nos genes *MMP2* C>T (rs243865) e *MMP9* A>G (rs17576) e a metodologia empregada para a realização das genotipagens foi a técnica de PCR em tempo real através da detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo utilizando o sistema TaqMan®.

Os SNPs tiveram como critério para seleção a MAF (do inglês, *minor allele frequency*) superior a 10% nas populações caucasiana e africana (que contribuíram para a formação étnica de nosso país) e a localização fora da região intrônica. Informações complementares, foram adquiridas em bancos de dados do estudo do genoma humano tais como: 1000 Genomas [<http://www.1000genomes.org>] e dbSNP Short Genetic Variations [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>].

O sistema TaqMan de detecção de polimorfismos consiste de sondas que possuem um marcador fluorescente (repórter) na extremidade 5', capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Entretanto, na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por um receptor de sinal luminoso (quencher), presente na extremidade 3' da sonda. Dessa forma, o sistema óptico do equipamento só é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação, mas, durante a amplificação, quando a sonda que se hibridizou ao produto-alvo é clivada pela atividade da exonuclease da enzima Taq DNA polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do quencher que não mais será capaz de absorver a luz emitida. Assim, ocorrerá um aumento na intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação do alvo. A principal vantagem deste método, é a hibridização da sonda em regiões previamente desenhadas, com emissão de

fluorescência, e geralmente são menos susceptíveis de obter resultados falso positivos (Applied Biosystems, 2014).

Todas as sondas e primers que foram utilizados estão disponíveis como ensaio pronto e validados para o uso em pesquisa de caráter científico no site [<https://products.appliedbiosystems.com>], para o SNP no *MMP2* (rs243865) o ensaio segue a identificação de C\_\_3225943\_10 e para o *MMP9* (rs17576) o ensaio está identificado como C\_\_11655963\_10. Para realização desta técnica foi utilizado o aparelho Rotor Gene 6000TM (Corbett Research, Austrália). As condições de reação foram estabelecidas de acordo com o protocolo recomendado pela empresa que comercializa as sondas (Life Technologies, Califórnia, USA).

Os procedimentos foram realizados utilizando-se a infraestrutura do Laboratório Central (LabCen) e do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), ambos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

#### **4.5.3 Análises Estatísticas**

A análise estatística foi realizada de forma descritiva com o auxílio do *software SPSS Statistics 19.0*. O teste Chi-quadrado foi utilizado para comparações entre variáveis categóricas e o Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações entre as variáveis contínuas. As probabilidades estimadas, a média e a mediana para curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e o teste de logrank, utilizado para comparar as diferenças entre as curvas. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

Foram selecionados 88 pacientes adultos com Leucemia Mieloide Aguda para o estudo. Todos foram genotipados para o polimorfismo do gene *MMP2* (rs243865) e 85 para o polimorfismo do gene *MMP9* (rs17576). No grupo *MMP2*, a média de idade dos pacientes foi 39,86 anos, sendo 42 indivíduos do sexo feminino e 46 do sexo masculino. No grupo *MMP9*, 40 pacientes eram do sexo feminino e 45 do sexo masculino, com média de idade de 40,63 anos.

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes estão sumarizadas nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Características clínico-laboratoriais – *MMP2*

	Todos		<i>MMP2</i> (rs243865) (modelo codominante)						P-valor <sup>3</sup>
	No.	%	C/C		C/T		T/T		
			No.	%	No.	%	No.	%	
Idade (anos)									0.062
18-40	45	52.9	34	58.6	11	45.8	0	-	
40-60	36	42.4	23	39.7	10	41.7	3	100	
>60	4	4.7	1	1.7	3	12.5	-	-	
Idade, mediana	39		35,7		46		46,6		0.030
Gênero									0,795
Feminino	42	47.7	28	47.5	12	46.2	2	66.7	
Masculino	46	52.3	31	52.5	14	53.8	1	33.3	
Subtipo FAB									0.806
M0	8	9.1	6	10.7	2	7.7	0	-	
M1	14	15.9	9	16.1	4	15.3	1	33.3	
M2	28	31.8	19	33.9	8	30.8	1	33.3	
M4	25	28.4	16	28.6	8	30.8	1	33.3	
M5	8	9.1	6	10.7	2	7.7	0	-	
M6	2	2.3	-	-	2	7.7	0	-	
Dados ausentes	3	3.4	-	-	-	-	-	-	
Risco citogenético <sup>1</sup>									0.221
Favorável	16	18.2	10	33.3	6	37.5	-	-	
Intermediário	25	28.4	15	50.0	10	62.5	-	-	
Adverso	5	5.7	5	16.7	-	-	-	-	
Dados ausentes	42	47.7	-	-	-	-	-	-	
<i>FLT3</i> -ITD									0,618
Mutado	16	18.2	9	16.7	6	24.0	2	66.7	
Não-mutado	66	75.0	45	83.3	19	76.0	1	33.3	
Dados ausentes	6	6.8	-	-	-	-	-	-	
Mutações <i>NPM1</i>									0.662
Mutado	17	19.3	10	16.9	6	23.1	1	33.3	
Não-mutado	71	80.7	49	83.1	20	76.9	2	66.7	
Dados ausentes	-	-	-	-	-	-	-	-	
Risco molecular <sup>2</sup>									0.584
Baixo risco	11	12.5	7	13.0	3	11.1	1	33.3	
Alto risco	71	80.7	47	87.0	22	81.5	2	66.7	
Dados ausentes	6	6.8	-	-	2	7.4	-	-	
WBC ( $\times 10^9/L$ ), mediana	37.4		61.4		44.5		91.7		0.303
Intervalo	0.5, 782.5		1.2, 435		6, 231		3.6, 11.4		
Hemoglobina (g/dL), mediana	8		7.8		8.6		7.7		0.214
Intervalo	3, 15.7		3.6, 11.5		5, 13.8		7.3, 7.8		
PLT ( $\times 10^9/L$ ), median	43		46		40.4		47		0.902
Intervalo	6, 652		6, 404		11, 212		20, 55		

## NOTAS:

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

2: O grupo molecular de alto risco foi definido como *NPM1*<sup>não-mutado</sup>/*FLT3*-ITD<sup>negativo</sup>, *NPM1*<sup>não-mutado</sup>/*FLT3*-ITD<sup>positivo</sup>, ou *NPM1*<sup>mutado</sup>/*FLT3*-ITD<sup>positivo</sup>. O grupo molecular de baixo risco foi definido pela presença que qualquer mutação no *NPM1* e ausência de mutações *FLT3*-ITD.

3: Os dados ausentes foram excluídos para o cálculo do P-valor.

**Tabela 3.** Características clínico-laboratoriais – *MMP9*

	Todos		<i>MMP9</i> (rs17576) (modelo codominante)						PValor <sup>3</sup>
	No.	%	A/A		A/G		G/G		
			No.	%	No.	%	No.	%	
Idade (anos)									0.519
18-39	45	54.9	16	53.3	23	54.8	6	60	
40-60	34	41.5	14	46,7	16	38.1	4	40	
>60	3	3.6	-		3	7.1	-	-	
Idade, mediana	39		39,3		37,7		37,4		0.030
Gênero									0,793
Feminino	40	47.0	14	42.4	21	50.0	5	50	
Masculino	45	53.0	19	57.6	21	50.0	5	50	
Subtipo FAB									0.462
M0	8	9.4	4	12.5	3	7.5	1	10	
M1	14	16.5	2	6.2	8	20.0	4	40	
M2	26	30.6	14	43.8	11	27.5	1	10	
M4	24	28.2	8	25.0	13	32.5	3	30	
M5	8	9.4	3	9.4	4	10.0	1	10	
M6	2	2.4	1	3.1	1	2.5	-	-	
Dados ausentes	3	3.5	-	-	-	-	-	-	
Risco citogenético <sup>1</sup>									0.310
Favorável	16	18.8	8	40	8	40.0	-	-	
Intermediário	25	29.4	9	45	11	55.0	5	83.3	
Adverso	5	5.9	3	15	1	5.0	1	16.7	
Dados ausentes	39	45.9	-	-	-	-	-	-	
<i>FLT3</i> -ITD									0,839
Mutado	16	18.8	7	21.9	8	20.5	1	12.5	
Não-mutado	63	74.1	25	78.1	31	79.5	7	87.5	
Dados ausentes	6	7.1	-	-	-	-	-	-	
Mutações <i>NPM1</i>									0.076
Mutado	16	18.8	3	9.1	9	21.4	4	40	
Não-mutado	69	81.2	30	90.9	33	78.6	6	60	
Dados ausentes	-	-	-	-	-	-	-	-	
Risco molecular <sup>2</sup>									0.083
Baixo risco	10	11.7	3	9.4	4	10.3	3	37.5	
Alto risco	69	81.2	29	90.6	35	89.7	5	62.5	
Dados ausentes	6	7.1	-	-	-	-	-	-	
WBC ( $\times 10^9/L$ ), mediana	37.4		60.9		57		37.7		0.726
Intervalo	0.5, 782.5		2.8, 312		0.6, 435		1.2, 231		
Hemoglobina (g/dL), mediana	8		7.9		8.4		8.65		0.265
Intervalo	3, 15.7		3.6, 10.7		5.5, 13.8		4.6, 11.5		
PLT ( $\times 10^9/L$ ), median	43		43		39		57		0.320
Intervalo	6, 652		6, 192		11, 209		24, 404		

## NOTAS:

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

2: O grupo molecular de alto risco foi definido como *NPM1*<sub>não-mutado</sub>/*FLT3*-ITD<sub>negativo</sub>, *NPM1*<sub>não-mutado</sub>/*FLT3*-ITD<sub>positivo</sub>, ou *NPM1*<sub>mutado</sub>/*FLT3*-ITD<sub>positivo</sub>. O grupo molecular de baixo risco foi definido pela presença que qualquer mutação no *NPM1* e ausência de mutações *FLT3*-ITD.

3: Os dados ausentes foram excluídos para o cálculo do P-valor.

## 5.1 *MMP2*

A mediana de idade para os pacientes desse grupo de acordo com o genótipo foi: C/C 35,7 anos; C/T 46 anos; T/T 46,6 anos ( $p=0,030$ ), mostrando que o homozigoto selvagem é mais frequente em indivíduos mais jovens.

Não foram encontradas associações para polimorfismo do gene *MMP2* (rs243865) quanto ao gênero ( $p= 0,795$ ), à classificação FAB ( $p= 0,795$ ), ao risco citogenético ( $p= 0,221$ ) ou ao risco molecular ( $p= 0,584$ ). O mesmo aconteceu quanto às análises dos dados laboratoriais: Leucometria ( $p= 0,303$ ); Hemoglobina ( $p= 0,214$ ) e número de plaquetas ( $p= 0,902$ ).

A taxa de Remissão Completa (CR) foi de 70,49%. Destes: 69,76% C/C; 27,90% C/T; e 2,34% T/T, sem significado estatístico ( $p= 0,807$ ).

Quando analisada a Sobrevida Global (SG), os pacientes C/C tiveram uma média de segmento de 553 dias (IC95%: 333 – 773). Para os pacientes C/T a média de segmento foi de 347 dias (IC95%: 154 – 451) e para os pacientes T/T, foi de 71 dias (IC95%: 4 – 137). Embora o alelo homozigoto variante tenha tido uma média de sobrevida global consideravelmente menor quando comparado aos alelos homozigoto selvagem e heterozigoto, essa diferença não atingiu significado estatístico ( $p= 0,743$ ) (Figura 4a).

A Sobrevida Livre de Doença (SLD) estimada em três anos foi de 53,3% para o homozigoto selvagem, 41,7% para o heterozigoto e 100% para o homozigoto variante, não sendo observadas diferenças entre as curvas ( $p= 0,912$ ) (Figura 4b).

## 5.2 *MMP9*

Para o polimorfismo do gene *MMP9*, a mediana de idade foi de 39,3 anos para os pacientes homozigotos selvagens, 37,7 anos para os pacientes heterozigotos e 37,4 anos para os pacientes homozigotos variantes. Os pacientes do sexo masculino correspondiam a 52,95% do grupo e as pacientes do sexo feminino,

a 47,05%. Quanto à classificação FAB, os subtipos M2 (31,7%) e M4 (29,2%) apresentaram maior frequência, enquanto a frequência mais baixa foi vista no subtipo M6 (2,4%). As frequências de idade ( $p= 0,519$ ), sexo ( $p= 0,793$ ) e subtipo FAB ( $p= 0,462$ ) foram similares entre os genótipos avaliados.

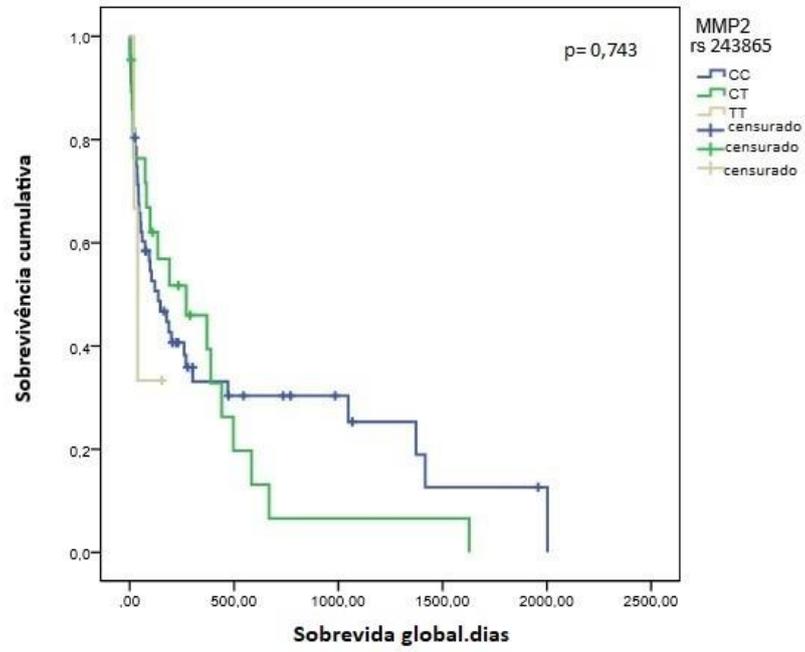
A sobrevida global estimada em 5 anos do grupo homocigoto selvagem foi de 21,4%, com média de segmento de 377 dias (IC95%: 161 – 593); do grupo heterocigoto foi de 25%, com média de segmento de 524 dias (IC95%: 129 – 271); enquanto que no grupo homocigoto variante esse valor foi de 40%, com média de segmento de 275 dias (IC95%: 161 – 390). Não foi observada diferença entre os grupos ( $p= 0,588$ ) (Figura 5a).

A remissão completa foi alcançada em 71,18% dos pacientes, sendo a maioria deles do grupo heterocigoto (A/G: 52,38%). Para os demais grupos a taxa de remissão completa foi de 33,34% (A/A) e 14,28% (G/G) ( $p= 0,929$ ).

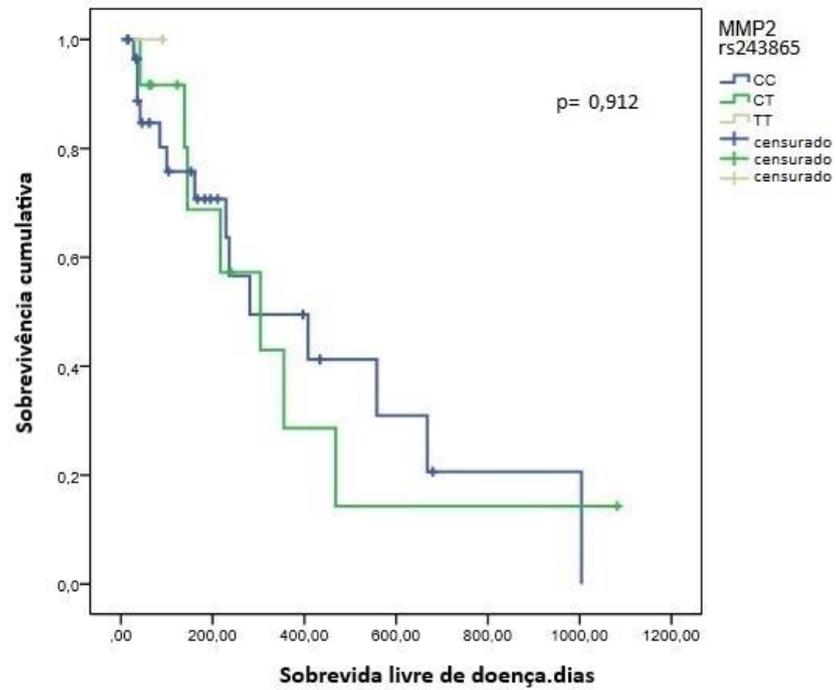
A média de sobrevida livre de doença (SLD) foi de 231 dias (IC95%: 85 – 376 dias) para os pacientes homocigotos selvagens; entretanto, para os pacientes heterocigotos e homocigotos variantes foi consideravelmente maior, 554 dias (IC95%: 340 – 768 dias) e 327 dias (IC95%: 224 – 429 dias), respectivamente ( $p= 0,039$ ) (Figura 5b). Dessa análise, pode-se concluir que pacientes homocigotos selvagens tem sobrevida livre de doença menor que os pacientes heterocigotos e homocigotos variantes.

**Figura 4. (a)** Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda frente ao polimorfismo do gene *MMP2*. **(b)** Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda frente ao polimorfismo do gene *MMP2*.

**a.**

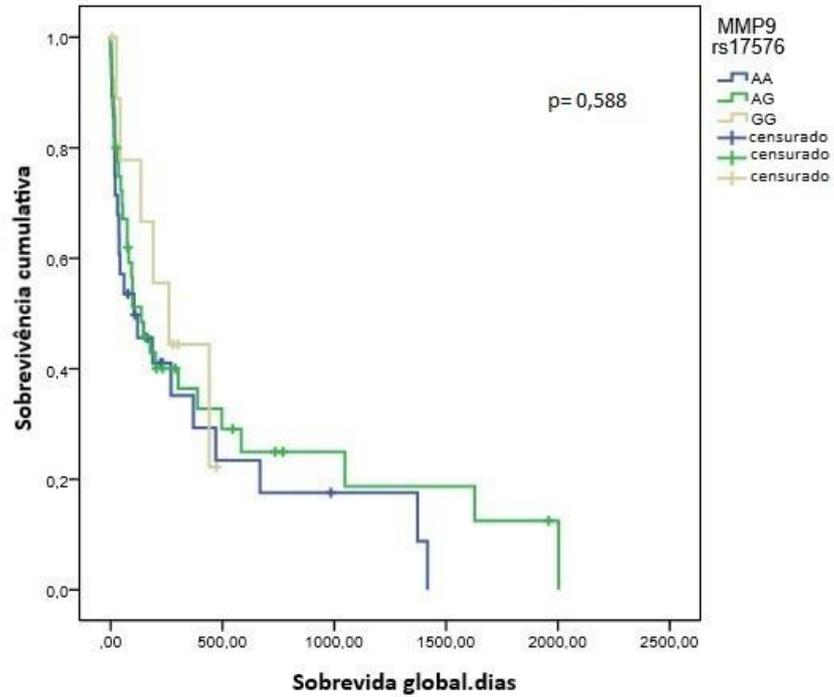


**b.**

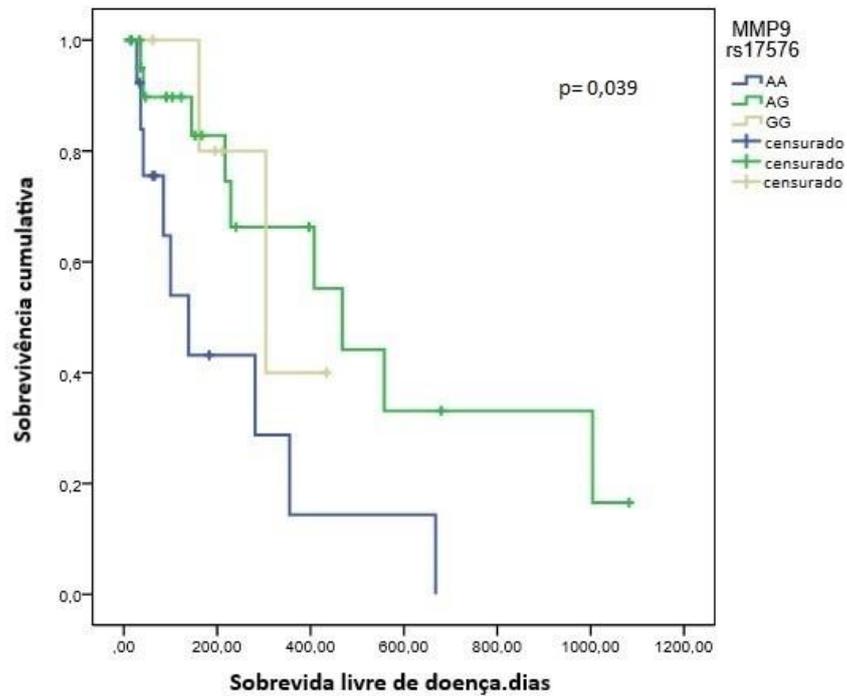


**Figura 5. (a)** Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda frente ao polimorfismo do gene *MMP9*. **(b)** Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda frente ao polimorfismo do gene *MMP9*.

**a.**



**b.**



## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas as associações dos polimorfismos nos genes *MMP2* (rs243865 (C>T)) e *MMP9* (rs17576 (A>G)) às características clínicas e laboratoriais da LMA.

As frequências genóticas do polimorfismo do gene *MMP2* encontradas em nosso trabalho (67% C/C, 29,5% C/T e 3,4% T/T) estão em consonância com um estudo anterior realizado por Chaudhary et al., em 2016, na população indiana (62.5% C/C, 31.3% C/T, 6,3% T/T). Nesse mesmo estudo, os autores relatam que a distribuição genotípica da frequência do alelo 'T' variante mostrou associação significativa (frequência do alelo T = 0,22,  $p < 0,035$ ) em comparação com controles saudáveis. Os autores buscaram também associação em relação às substâncias químicas induzidas, como diferentes fertilizantes agrícolas, pesticidas e pessoas expostas a raios X mais de cinco vezes durante a vida, mas o resultado não foi relevante.

O trabalho citado acima foi o único encontrado na literatura acerca desses polimorfismos e a LMA. Entretanto, em 2002, Li et al., afirmaram que o polimorfismo do gene *MMP2* pode estar associado ao risco de LLA. E um estudo recente avaliou o polimorfismo rs243865 (C>T) na Leucemia Linfóide Aguda, em um grupo de crianças em Taiwan e concluiu que nenhum dos genótipos variantes C/T ou T/T no gene *MMP2* pode, em combinação com a idade ou o sexo, influenciar a susceptibilidade do LLA infantil (HSU et al., 2019).

Para o polimorfismo rs17576 (A>G), nada foi encontrado na literatura para tal correlação. Contudo, alguns estudos relacionaram a expressão gênica da *MMP9* com as neoplasias hematológicas.

Janowska-Wieczorek et al., em 2000, afirmou que o aumento percentual de blastos está associado a um aumento de expressão de *MMP9* em tecido sanguíneo. O mesmo estudo encontrou também uma expressão de *MMP9* aumentada em LMA do tipo M4 (FAB), fato que pode ser explicado pelo componente monocítico nesse subtipo da doença, visto que os monócitos também expressam e sintetizam a *MMP9*. Em nosso estudo, entretanto, nenhuma correlação foi observada.

No que diz respeito às associações desses SNP com as características clínicas dos pacientes, foi observado que a mediana de idade para os pacientes desse grupo *MMP2* (rs243865 (C>T)) de acordo com o genótipo foi: C/C 35,7 anos; C/T 46 anos; T/T 46,6 anos ( $p=0,030$ ), mostrando que o homozigoto selvagem pode estar associado ao desenvolvimento da LMA em indivíduos mais jovens. Esse achado pode ser considerado um indicativo de bom prognóstico, visto que pacientes de idade mais avançada em geral tem um pior desfecho clínico devido à ocorrência simultânea de comorbidades e maior frequência de alterações citogenéticas de alto risco.

Para o polimorfismo do gene *MMP9*, nossa análise concluiu que pacientes homozigotos selvagens tem sobrevida livre de doença menor que os pacientes heterozigotos e homozigotos variantes ( $p=0,039$ ). Em 2017, um grupo de pesquisadores do Reino Unido observou que as células do estroma da medula óssea dentro do microambiente de LMA transferem suas mitocôndrias para blastos da LMA; essas mitocôndrias que se deslocam são funcionalmente ativas, indicando que os blastos da LMA estão usando esse fenômeno biológico para sua vantagem metabólica. Também foi observado que o tratamento de quimioterapia aumenta a transferência mitocondrial. Os autores então propuseram que a quimioterapia aumenta ainda mais o já alto ambiente de estresse oxidativo da medula óssea gerada pelos blastos na LMA e, assim, aumenta ainda mais a transferência mitocondrial; levantando a hipótese de que, com uma combinação de hipoxia e quimioterapia na medula óssea, a pequena população de blastos sobreviventes que permanecem após o tratamento de quimioterapia pode ter uma quantidade particularmente melhorada de mitocôndria. Funcionalmente, isso ajudaria a sobrevivência do tumor e, eventualmente, resultaria em recaída (MARLEIN et al., 2017)

Contextualizando esses achados com as MMPs, é teoricamente possível que as mesmas possam ter um papel fundamental na manutenção do tecido leucêmico e progressão da doença devido a sua funcionalidade no microambiente hematopoético (JANOWSKA-WIECZOREK et al., 2000). Sabendo que o polimorfismo rs17576 (A>G) pode alterar a capacidade de ligação da enzima com seu substrato, os genótipos A/G e G/G estariam “protegidos” por expressar uma menor quantidade de *MMP9*, resultando em menor resistência blástica, o que explicaria seu maior tempo de sobrevida livre de doença.

A busca pela gênese molecular que leva ao desenvolvimento leucêmico e a necessidade de novos marcadores prognósticos é constante no estudo da LMA. O presente trabalho é o único realizado na população brasileira correlacionando polimorfismos dos genes *MMP2* e *MMP9* com as características clínicas e laboratoriais da LMA e também o único que fez associação desses polimorfismos com o desfecho clínico dos pacientes, através da avaliação de sobrevida global, sobrevida livre de doença e taxa de remissão completa. Para validação dos nossos resultados, são necessários estudos com maior número de pacientes e com maior variabilidade populacional, afim de esclarecer como as MMPs atuam na LMA.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- As frequências genótípicas do nosso estudo para o polimorfismo *MMP2* (rs243865 (C>T)) foram: 67% C/C, 29,5% C/T e 3,4% T/T. Para o polimorfismo *MMP9* (rs17576 (A>G)) as frequências foram 37,5% A/A, 47,7% A/G e 11,4% G/G.
- Para o polimorfismo *MMP2* (rs243865 (C>T)), a mediana de idade para os pacientes foi: C/C 35,7 anos; C/T 46 anos; T/T 46,6 anos ( $p=0,030$ ), mostrando que o homocigoto selvagem pode estar associado ao desenvolvimento da LMA em indivíduos mais jovens; achado que pode ser considerado um indicativo de bom prognóstico.
- Para o polimorfismo *MMP9* (rs17576 (A>G)), a média de sobrevida livre de doença (SLD) teve diferença significativa ( $p=0,039$ ) para pacientes homocigotos selvagens, que tem SLD menor que os pacientes heterocigotos e homocigotos variantes; indicando um pior prognóstico.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSSON A, JOHANSSON B, LASSEN C, MITELMAN F, BILLSTRÖM R E FIORETOS T. Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. **European Journal of Haematology**. v.72 p.307–313, 2004.
- APPELBAUM F.R, GUNDACKER H, HEAD D.R, SLOVAK M.L, WILLMAN C.L, GODWIN J.E, ANDERSON J.E E PETERSDORF S.H. Age and acute myeloid leukemia. **Blood** v.107, p.3481-3485, 2006.
- BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR e SULTAN C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. FrenchAmerican-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol** 33: 451-458
- BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL M, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR e SULTAN C (1985) 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
- BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR e SULTAN C (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **Br J Haematol** 78: 325-329
- BONNANS C, CHOU J, WERB Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Rev Mol Cell Biol**. 2014 Dec; 15 (12):786-801.
- BRAUER PR. MMPs – Role in cardiovascular development and disease. **Front Biosci** 2006; 11:447-478
- BULLINGER L and ARMSTRONG SA (2010) HELP for AML: Methylation Profiling Opens New Avenues. **Cancer Cell**
- BURLAKA AP, GANUSEVICH II, GAFUROV MR, LUKIN SM, SIDORIK EP. Stomach Cancer: Interconnection between the Redox State, Activity of MMP-2, MMP-9 and Stage of Tumor Growth. **Cancer Microenviron**. 2016 Apr; 9(1):27-32.
- BURNETT AK, HILLS RK, MILLIGAN D, KJELDEN L, KELL J, RUSSELL NH, YIN JA, HUNTER A, GOLDSTONE AH, WHEATLEY K. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. **Journal of Clinical Oncology** v.29, p.369-377, 2011.
- CAPRA M, VILELLA L, PEREIRA WV, COSER VM, FERNANDES MS, SCHILLING MA, ALMEIDA D, GROSS M, LEITE M, HELLWIG T et al. Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. **Leukemia Lymphoma** v.48, p.2381-2386, 2007.
- CHAUDHARY AK, CHAUDHARY S, GHOSH K, et al. Secretion and expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 from bone marrow mononuclear cells in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **Asian Pac J Cancer Prev** 2016; 17:1519–29.

COLLINS FS, BROOKS LD, CHAKRAVARTI A (1998) A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. **Genome Research** 8:1229-1231.

CONWAY O'BRIEN E, PRIDEAUX S and CHEVASSUT T (2014) The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. **Adv Hematol** 2014:103175.

DOCHERTY AJ, LYONS A, SMITH BJ, WRIGHT EM, STEPHENS PE, HARRIS TJ, MURPHY G, REYNOLDS JJ. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. **Nature**. 1985 Nov 318(6041):66-9.

DÖHNER H, ESTEY E, AMADORI S, APPELBAUM FR, BÜCHNER T, BURNETT A. K, DOMBRET H, FENAUX P, GRIMWADE D, LARSON R A. et al. (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood** 115:453–474.

DONGMEI FAN, YING WANG, PENGWEI QI, Yawei CHEN, PO XU, XIANAN YANG, XIMENG JIN, XIAOYU TIAN. MicroRNA-183 functions as the tumor suppressor via inhibiting cellular invasion and metastasis by targeting MMP-9 in cervical cancer, **Gynecologic Oncology** (2016).

DORES GM, DEVESA SS, CURTIS RE, LINET MS and MORTON LM (2011) Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. **Blood** 34–43.

DOS REIS ST, PONTES J JR, VILLANOVA FE, BORRA PM, ANTUNES AA, DALL'OGGIO MF, SROUGI M, LEITE KR. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases: susceptibility and prognostic implications for prostate cancer. **J Urol**. 2009 May;181(5): 2320 -5

ESTEY E and DÖHNER H (2006) Acute myeloid leukaemia. **Lancet** 368:1894–1907.

GILLILAND G D and GRIFFIN JD (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood** 100:1532–1542

GREENWOOD MJ, SEFTEL MD, RICHARDSON C, BARBARIC D, BARNETT MJ, BRUYERE H, FORREST DL, HORSMAN DE, SMITH C, SONG K et al. Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. **Leukemia Lymphoma** v47, p.1245-1252, 2006.

GRIMWADE D, HILLS R.K, MOORMAN A.V, WALKER H, CHATTERS S, GOLDSTONE A.H, WHEATLEY K, HARRISON C.J E BURNETT A.K. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. **Blood** v.116, p.354-365, 2010

HOFFBRAND A.V; MOSS P.A.H; PETTIT J.E. Leucemias Agudas. In: Hoffbrand, Moss, Pettit. Fundamentos em Hematologia, 5ª ed., Porto Alegre: **ARTMED**, 2008, p. 167-183.

HSU PC, PEI JS, CHEN CC, CHANG WS, KUO CC, CHENG SP, TSAI CW, BAU DT AND GONG CL: Association of matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphisms with the risk of childhood leukemia. **Anticancer Res** 39: 1185-1190, 2019.

HUA H, LI M, LUO T, YIN Y AND JIANG Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. **Cell Mol Life Sci** 68: 3853-3868, 2011.

HUHTALA P, EDDY RL, FAN YS, BYERS MG, SHOWS TB, TRYGGVASON K. Completion of the primary structure of the human type IV collagenase preproenzyme and assignment of the gene (CLG4) to the q21 region of chromosome 16. **Genomics**. 1990 Mar 6(3):554-9.

HUNG WC, TSENG WL, SHIEA J AND CHANG HC. Skp2 overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of lung cancer cells. **Cancer Lett** 288: 156-161, 2010.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science** 326, 1216–1219 (2009).

IM, A.P.; SEHGAL, A.R.; CARROLL, M.P.; SMITH, B.D.; TEFFERI, A.; JOHNSON, D.E. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. **Leukemia**, v. 28, p. 1774-1783, 2014.

JANOWSKA-WIECZOREK A, AKINOBU MATSUZAKI & LEAH A. MARQUEZ (2000) Matrix Metalloproteinases in the Hematopoietic Microenvironment, **Hematology**, 4:6, 515-527.

JULIUSSON G, ANTUNOVIC P, DEROLF A, LEHMANN S, MÖLLGÅRD L, STOCKELBERG D, TIDEFELT U, WAHLIN A E HÖGLUND M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. **Blood**, v.113, p.4179-4187, 2009

KESSENBROCK K, PLAKS V, WERB Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell** 2010;141(1):52-67.

KUITTINEN O, SAVOLAINEN ER, KOISTINEN P, MOTTONEN M, TURPEENNIEMI-HUJANEN T: MMP-2 and MMP-9 expression in adult and childhood acute lymphatic leukemia (ALL). **Leuk Res** 2001; 25:125-131.

KUITTINEN O, SAVOLAINEN ER, KOISTINEN P, TURPEENNIEMI-HUJANEN T: Gelatinase A and B (MMP-2, MMP-9) in leukaemia MMP-2 may indicate a good prognosis in AML. **Anticancer Res** 1999; 19:4395-4400.

LIN CM ZENG YL XIAO M MEI XQ SHEN LY GUO MX et al. The relationship between MMP2 -1306C>T and MMP9 -1562C>T polymorphisms and the risk and prognosis of T-cell acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. **Cell Physiol Biochem** 2017; 42: 1458-68.

LIN LI, LIN DT, CHANG CJ, et al. Marrow matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMP in acute leukaemia: potential role of MMP-9 as a surrogate marker to monitor leukaemic status in patients with acute myelogenous leukaemia. **Br J Haematol** 2002; 117: 835–41

LIU B., CUI J., SUN J., LI J., HAN X., GUO J., YI M., AMIZUKA N., XU X., LI M. Immunolocalization of MMP9 and MMP2 in osteolytic metastasis originating from MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Molecular Medicine Reports** 14: 1099-1106, 2016.

LOWENBERG B, DOWNING JR and BURNETT A (1999) Acute Myeloid Leukemia. **N Engl J Med** 341:1051–1062.

- MARLEIN CR, ZAITSEVA L, PIDDOCK RE, ROBINSON SD, EDWARDS DR, SHAFAT MS, ZHOU Z, LAWES M, BOWLES KM, RUSHWORTH SA. NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. **Blood**. 2017 Oct 5;130 (14):1649-1660.
- MENDES O., KIM H.T., LUNGU G., STOICA G. MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2. **Clin Exp Metastasis** (2007) 24:341–351.
- MIAO X, YU C, TAN W, XIONG P, LIANG G, LU W, LIN D (2003) A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. **Cancer Res** 63:3987–3990
- MOORE J.O, GEORGE S.L, DODGE R.K, AMREIN P.C, POWELL B.L, KOLITZ J.E, BAER M.R, DAVEY F.R, BLOOMFIELD C.D, LARSON R.A, SCHIFFER C.A. Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as postremission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222. **Blood**. v.105, p.3420-3427, 2005.
- MRÓZEK K, MARCUCCI G, NICOLET D, MAHARRY KS, BECKER H, WHITMAN SP, METZELER KH, SCHWIND S, WU YZ, KOHLSCHMIDT J. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Oncology** v.30, p.4515-4523, 2012
- NELSON AR, FINGLETON B, ROTHENBERG ML, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **J Clin Oncol**. 2000 Mar 18(5):1135-49
- OHSHIBA T, MIYAURA C, INADA M, ITO A. Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis. **Br J Cancer** 88: 1318-1326, 2003.
- PACKARD BZ, ARTYM V V, KOMORIYA A, YAMADA KM. Direct visualization of protease activity on cells migrating in three-dimensions. **Matrix Biol** 2009;28(1):3-10.
- PAGE-MCCAW A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007 Mar 8(3): 221–233.
- PAGNANO K.B, TRAINA F, TAKAHASHI T, OLIVEIRA G.B, ROSSINI M.S, LORAND-METZE I, VIGORITO A.C, MIRANDA E.C, DE SOUZA C.A. Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. **Sao Paulo Medical Journal**. v 1 p.118-173, 2000.
- PARK JK, PARK SH, SO K, BAE IH, YOO YD. ICAM-3 enhances the migratory and invasive potential of human non-small cell lung cancer cells by inducing MMP-2 and MMP-9 via Akt and CREB. **Int J Oncol** 36: 181-192, 2010.
- PATTERSON M L, S.J. ATKINSON, et al., Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP- 2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain, **FEBS Lett**. 503 (2001) 158–162.
- PETERSDORF S.H, RANKIN C, HEAD D.R, TEREBELO H.R, WILLMAN C.L, BALCERZAK S.P, KARNAD A.B, DAKHIL S.R, APPELBAUM F.R. Phase II evaluation of an intensified induction therapy with standard daunomycin and cytarabine followed by high dose cytarabine

for adults with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study (SWOG-9500). **American Journal of Hematology** v.82, p.1056-1062, 2007.

PRICE SJ, GREAVES DR, WATKINS H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. **J Biol Chem**. 2001 Mar 276(10):7549-58.

REGO MF, PINHEIRO GS, METZE K, LORAND-METZE. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. **Brazilian Journal of Medical Biology** v.36 p.331-337 2003.

RIES C, LOHER F, ZANG C, et al (1999). Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. **Clin Cancer Res**, 5, 1115-24.

OKADA R, M. NAITO, Y. HATTORI et al., "Matrix metalloproteinase 9 gene polymorphisms are associated with a multiple family history of gastric cancer," **Gastric Cancer**, vol. 20, no. 2, pp. 246–253, 2017.

ROZARIO, T. & DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Dev. Biol.** 341, 126–140 (2010).

ROY R, J. YANG, M.A. Moses, Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer, **J. Clin. Oncol.** 27 (2009) 5287–5297.

SANDERS M A and VALK PJM (2013) The evolving molecular genetic landscape in acute myeloid leukaemia. **Curr Opin Hematol** 20:79–85.

SAVASOGLU, K.; ERDAL, M. E. Association of MMP-2 (-1306 C > T), MMP-9 (-1562 C > T) Gene Polymorphism and the Formation of the Hematological Malignancies. **Iranian Journal of Public Health**, v. 45, n. 3, p. 392–393, 2016.

SCRIDELI CA, CORTEZ MA, YUNES JA, QUEIROZ RG, VALERA ET, DA MATA JF, TOLEDO SR, PAVONI-FERREIRA P, LEE ML, PETRILLI AS, BRANDALISE SR, TONE LG: mRNA expression of matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) 1 and 2 in childhood acute lymphoblastic leukemia: potential role of TIMP1 as an adverse prognostic factor. **Leuk Res** 2010; 34:32-37.

SUN H H, A. VAYNBLAT, and H. I. PASS, "Diagnosis and prognosis—review of biomarkers for mesothelioma," **Annals of Translational Medicine**, vol. 5, no. 11, p. 244, 2017.

TRAVAGLINO E, BENATTI C, MALCOVATI L, DELLA PORTA MG, GALLI A, BONETTI E, ROSTI V, CAZZOLA M, INVERNIZZI R: Biological and clinical relevance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol** 2008; 80:216-226.

TSURU A, SETOGUCHI T, MATSUNOSHITA Y, NAGAO-KITAMOTO H, NAGANO S, YOKOUCHI M, et al. Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 promotes osteosarcoma metastasis via matrix metalloproteinase 9 expression. **British journal of cancer**. 2015;112: 1232-40.

VAN DEN STEEN P E, B. DUBOIS, et al., Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 37 (2002) 375–536.

VARDIMAN JW, THIELE J, ARBER DA, BRUNNING RD, BOROWITZ MJ, PORWIT A, HARRIS NL, LE BEAU MM, HELLSTRÖM-LINDBERG E E TEFFERI A. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood** v.114 p.937-951, 2009.

VELLOSO E.D.R.P, MOTTA C.H.A.S, FURTADO J.B, BACAL N.S, SILVEIRA P.A.A, MOYSES C.B, SITNIK R E PINHO J.R.R. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. **Einstein** v9, p184189, 2011.

WENG H, ZENG XT, WANG XH, LIU TZ, HE DL. Genetic Association between Matrix Metalloproteinases Gene Polymorphisms and Risk of Prostate Cancer: A Meta-Analysis. **Front Physiol.** 2017;8:975

WHIBLEY C, PHAROAH P.D.P, HOLLSTEIN A. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nature Reviews Cancer.** V.9, P.95-107. 2009.

WU J, ZHANG L, LUO H, ZHU Z, ZHANG C, HOU Y. Association of matrix metalloproteinases-9 gene polymorphisms with genetic susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. **DNA Cell Biol.** 2008 Oct 27(10):553-7

XU E, LAI M, LV B, XING X, HUANG Q, XIA X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 324: 999-1003 103

XU X-M, ZHANG Y, QU D, FENG X-W, CHEN Y, ZHAO L. Osthole suppresses migration and invasion of A549 human lung cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in vitro. **Molecular medicine reports.** 2012; 6:1018-22.

ZAGO M.A, FALCÃO R.P, PASQUINI, BENICIO M.T.L, REGO E.M. Leucemias Mieloide Aguda no Adulto in: **Tratado de Hematologia**, Atheneu, 2013, p.343-350.

ZHOU P, DU LF, LV GQ, et al. Current evidence on the relationship between four polymorphisms in the matrix metalloproteinases (MMP) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2011;127: 813–8.

ZHOU Y, YU C, MIAO X, WANG Y, TAN W, SUN T, ZHANG X, XIONG P, LIN D (2005) Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility. **Carcinogenesis** 26:1117–112

## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**LABORATÓRIO CENTRAL**

### 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 Antônio Roberto Lucena de Araújo, 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 extrajudicial. 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

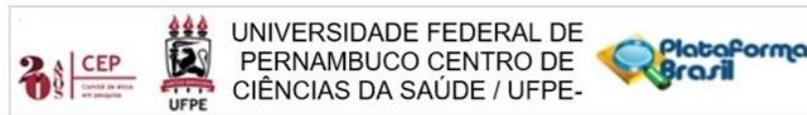
Local e data: \_\_\_\_\_

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 A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



### 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

Continuação 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.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Substanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave

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