Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

LUCAS MATHEUS BARRETO SANTANA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO POLIMORFISMO *TP53* ARG72PRO EM LINHAGENS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Recife
2021

LUCAS MATHEUS BARRETO SANTANA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO POLIMORFISMO *TP53* ARG72PRO EM LINHAGENS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo

Coorientadores: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Prof. Dr. Rafael Freitas de Oliveira França

Recife

2021

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santana, Lucas Matheus Barreto
Avaliação funcional do polimorfismo TP53 Arg72Pro em linhagens celulares de leucemia mieloide aguda / Lucas Matheus Barreto Santana - 2021.
70 folhas: il., fig., tab.
Orientador: Antônio Roberto Lucena de Araújo
Coorientadores: Marcos André Cavalcanti Bezerra
Rafael Freitas de Oliveira França
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2021.
Inclui referências.

1. Neoplasias hematológicas 2. Fatores germinativos 3. Ensaio de MTT I. Araújo, Antônio Roberto Lucena de (Orientador) II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Coorientador) III. França, Rafael Freitas de Oliveira (Coorientador) IV. Título

597.72 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2021-370

LUCAS MATHEUS BARRETO SANTANA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO POLIMORFISMO *TP53* ARG72PRO EM LINHAGENS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico Recife, como requisito para a obtenção do título de Mestre em genética Área de concentração: Biologia molecular.

.

Aprovado em: 29/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

_____
Profª. Drª. Antônio Roberto Lucena de Araújo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profª. Drª. Rafael Lima Guimarães (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profº. Dr. Anna Jéssica Duarte Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profº. Dr. Juan Luiz Coelho da Silva (Examinador Externo)
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A realização desse mestrado foi possível graças ajuda de diversas pessoas. Sou profundamente grato a cada um que me proporcionou chegar até o final do meu tão desejado curso de mestrado. Inicialmente, quero agradecer a Alexandre Gomes, Jéssica de Oliveira e Denise Queiroga, pois sem a ajuda e conselhos de vocês eu não teria conseguido nem iniciar o curso.

Agradeço ao meu orientador Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo e aos meus coorientadores Dr. Marcos André Cavalcanti e Dr. Rafael Freitas de Oliveira França, pela oportunidade que me foi dada.

Agradeço a todos os meus colegas do NHCL, LEMTE e LaViTE, pelo companheirismo e ensinamentos. Em especial, a Pedro Luiz, Lígia Rosa e Anna Jéssica, por me ensinarem como buscar a solução de problemas, admirar e fazer ciência.

Agradeço ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM), pela colaboração na realização deste trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pela concessão de bolsa e auxílios financeiros que permitiram a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus por sempre estar comigo e aos meus familiares e amigos por todo o suporte, conselhos e apoio.

RESUMO

Alterações cromossômicas estruturais juntamente com mutações somáticas adquiridas são frequentemente identificadas em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), sendo utilizadas para definir subgrupos distintos de pacientes quanto ao seu prognóstico. Apesar da sua evidente importância, a contribuição dos fatores germinativos sempre foi subestimada na patogênese e evolução clonal da LMA. Dentre as diferentes variantes genéticas que são descritas como relevantes no câncer, merece destaque o polimorfismo presente no gene *TP53* Arg72Pro (G215C), particularmente por sua frequência e seu papel como um modulador da atividade proteica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel funcional do polimorfismo *TP53* Arg72Pro em linhagem celular de LMA. Primeiro foram construídos vetores lentivirais contendo as variantes polimórficas *TP53*-Arg e *TP53*-Pro72. Em seguida, estes vetores foram utilizados para infectar as células leucêmicas da linhagem THP-1 (células com expressão nula do gene *TP53*). Após a transfecção lentiviral e subsequente seleção das células infectadas, estas células foram utilizadas em ensaios de proliferação celular e apoptose. Não foi observada diferença nas taxas de proliferação celular das células leucêmicas THP-1 que expressavam a variante Arg ou Pro72 da proteína p53. No entanto, as células contendo a variante Arg72 foram mais sensíveis a apoptose induzida por citarabina, um quimioterápico frequentemente utilizado da prática clínica. Dessa forma, é possível que o polimorfismo *TP53* Arg72Pro module a atividade da p53 na LMA.

Palavras-chave: neoplasias hematológicas; fatores germinativos; ensaio de MTT.

ABSTRACT

Chromosomal changes with acquired somatic mutations are frequently identified in patients with acute myeloid leukemia (AML), and used to define different subgroups of patients regarding their prognosis. Despite its evident importance, a contribution from germinative factors has always been underestimated in the pathogenesis and clonal evolution of AML. Among the different genetic variants that are relevant in cancer, it is worth mentioning the polymorphism present in the *TP53* Arg72Pro gene (G215C), particularly for its frequency and role as a modulator of protein activity. The present work aims to evaluate the functional role of the *TP53* Arg72Pro polymorphism in AML cell line. First, lentiviral vectors were constructed containing polymorphic variants *TP53*-Arg and *TP53*-Pro72. These vectors were then used to infect leukemic cells THP-1 cell line (cells with null expression of the TP53 gene). After lentiviral transfection and subsequent selection of infected cells, these cells were used in cell proliferation and apoptosis assays. No difference was observed in cell proliferation rates of THP-1 leukemic cells that expressed the Arg or Pro72 variant of the p53 protein. However, cells containing the Arg72 variant were more sensitive to cytarabine-induced apoptosis, a chemotherapy frequently used in clinical practice. Thus, it is possible that the *TP53* polymorphism act in modulation of protein activity of the p53 in AML.

Keywords: hematologic neoplasms; germinative factors; MTT assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lâmina de paciente com LMA observada em microscópio óptico Pág. 16

Figura 2 - Estrutura da p53 Pág. 31

Figura 3 - Funções celulares que a p53 participa Pág. 32

Figura 4 - Backbone do vetor de expressão pMeg Pág. 42

Figura 5 - Digestão enzimática dos plasmídeos com as enzimas NheI e Bam HI Pág. 49

Figura 6 - Eletroferograma do sequenciamento dos plasmídeos contendo o gene *TP53* Pág. 50

Figura 7 -GFP observada em microscópio de imunofluorescência nos 3 grupos de células Pág. 51

Figura 8 - Analise realizada em citometro de fluxo quanto a expressão da GFP nas células Pág. 52

Figura 9 - Eletroforese com o produto da PCR utilizando primers para o cDNA da p53 Pág. 53

Figura 10 - Taxas de crescimento celular a cada 24 horas para os grupos pMeg, Arg72 e Pro72 Pág. 54

Figura 11 - Taxas de absorbância dos diferentes grupos observadas após o ensaio de MTT Pág. 55

Figura 12 - Taxas de viabilidade celular dos grupos tratados diferentes concentrações de Ara-C Pág. 56

Figura 13 - IC_{50} dos grupos pMeg, pMeg Arg72 e pMeg Pro72 Pág. 57

Figura 14 - Taxas de viabilidade celular dos grupos tratados diferentes concentrações de ATO Pág. 58

Figura 15 - IC_{50} dos grupos pMeg, pMeg Arg72 e pMeg Pro72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lâmina de paciente com LMA observada em microscópio óptico Pág. 21

Tabela 2 - Estratificação por risco genético de pacientes com LMA da ELN 2017 Pág. 23

Tabela 3 - Concentrações dos reagentes utilizados nas reações de sequenciamento Pág. 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
µM	Micromolar
Ara-C	Citarabina
ATO	Trióxido de Arsênio
ELN	European LeukemiaNet
GFP	Proteína verde fluorescente
HPV	Papilomavírus Humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LMA	Leucemia mieloide aguda
MO	Medula óssea
nM	Nanomolar
OMS	Organização mundial de saúde
pb	Pares de base
pMEG	pCDH1-MCS1-EF1-GFP-Puro
RC	Remissão completa
SG	Sobrevida global
SP	Sangue periférico
t-LMA	Leucemia mieloide aguda relacionada ao tratamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DA LITERATURA 15
2.1 Leucemia mieloide aguda 15
2.1.1 Patogênese 16
2.1.2 Epidemiologia 19
2.1.3 Classificação 20
2.1.4 Diagnóstico e prognóstico 23
2.1.5 Tratamento 25
2.1.6 Variantes genéticas e a LMA 28
2.2 O gene *TP53* 29
2.2.1 Estrutura 30
2.2.2 Função 31
2.2.3 Regulação 33
2.2.4 Isoformas 34
2.2.5 Mutações 35
2.2.6 Polimorfismos 35
2.2.7 O polimorfismo Arg72Pro 36
3 OBJETIVOS 40
3.1 Objetivo geral 40
3.2 Objetivos específicos 40
4 MATERIAL E MÉTODOS 41
4.1 Subclonagem 41
4.2 Sequenciamento 42
4.3 Cultivo celular 43
4.4 Produção lentiviral 43
4.5 Infecção lentiviral e seleção 44
4.6 Confirmação da inserção do inserto por PCR 45
4.7 Ensaios *in vitro* 46
4.7.1 Ensaio de proliferação celular 46
4.7.2 Ensaio de MTT 47
4.8 Análise estatística 47
5. RESULTADOS 49

5.1 Subclonagem 49
5.2 Sequenciamento 49
5.3 Infecção das células-alvo 50
5.4 Confirmação do inserto no genoma das células 52
5.5 Ensaio de proliferação celular 53
5.6 Ensaio de MTT 55
6 DISCUSSÃO 60
7 CONCLUSÕES 63
REFERÊNCIAS 64

1 INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) constitui um grupo heterogêneo de neoplásicos malignas que afetam os progenitores hematopoiéticos da linhagem mieloide. As células leucêmicas tornam-se incapazes de responder aos estímulos de apoptose, parada do ciclo celular e diferenciação, além de aumentar sua capacidade proliferativa e, consequentemente, se acumular em diferentes tecidos. Nas últimas décadas, alterações cromossômicas estruturais juntamente com mutações somáticas foram identificadas em pacientes com LMA, sendo atualmente utilizadas para definir subgrupos distintos de pacientes. No entanto, apesar de sua evidente importância, a contribuição de fatores germinativos sempre foi subestimada na patogênese e evolução clonal desta doença. Embora evidências recentes tenham demonstrado que variantes genéticas germinativas são relevantes para a patogênese de neoplasias mieloides, incluindo a LMA. Neste contexto, merece destaque o gene supressor de tumor *TP53*.

Alterações no gene *TP53* (incluindo mutações, deleções ou ambos) são frequentemente associadas com idade avançada, alterações cromossômicas estruturais complexas e desfecho clínico adverso. Apesar de raramente mutado em paciente adultos com LMA, vários polimorfismos foram descritos neste gene. Dentre os quais merece destaque o polimorfismo Arg72Pro, que tem sido objeto de estudo de diversos trabalhos, particularmente por sua frequência e seu papel como um modulador da atividade apoptótica da p53.

Embora a maioria dos trabalhos descrevam o alelo variante Pro72 como um fator de mau prognóstico, alguns relatos suportam a teoria de que este polimorfismo possa levar a diferentes desfechos, a depender do tipo de câncer e

do tratamento adotado. Embora extensivamente estudado em tumores sólidos, pouco se sabe sobre o impacto prognóstico deste polimorfismo em neoplasias hematológicas. Em um dos poucos trabalhos que analisaram o papel do polimorfismo Arg72Pro na LMA, foi relatada uma associação entre os pacientes adultos com LMA tratados com o protocolo terapêutico e um prognóstico favorável para o genótipo homozigoto variante *TP53* Pro / Pro. Contudo, as razões para uma resposta diferenciada ao tratamento permanecem desconhecidas.

A proposta do presente trabalho é, utilizando células de linhagem de LMA, avaliar *in vitro* o papel funcional do polimorfismo *TP53* Arg72Pro frente as taxas de proliferação e a resposta aos agentes indutores de apoptose aplicados na prática clínica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucemia mieloide aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) constitui um grupo heterogêneo de doenças neoplásicas malignas que afetam os progenitores hematopoiéticos (blastos) da linhagem mieloide, sendo caracterizada pela parada do processo de maturação das células, ausência de resposta aos estímulos de parada do ciclo celular e apoptose, além de sua expansão clonal de forma desordenada, e consequente acúmulo destas células em diferentes tecidos. Como na maioria das neoplasias, a LMA é uma doença complexa e dinâmica, apresenta múltiplas mutações somáticas, clones concorrentes entre a população leucêmica e evolução ao longo do tempo (Khwaja *et al*., 2016; Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016). No entanto, apresenta uma baixa taxa de sobrevida global (SG) em relação a outros tipos de câncer e a menor taxa de sobrevivência entre todas as leucemias (Shallis *et al*., 2019).

Os blastos leucêmicos perdem a capacidade de passar pelo processo natural de maturação e, por serem imaturos, não realizam as funções celulares destinadas a suas respectivas células maduras. Devido a isso, as manifestações clínicas da LMA decorrem da diminuição de leucócitos maduros funcionais no organismo e acúmulo dos blastos leucêmicos na medula óssea (MO), sangue periférico (SP) e outros tecidos. Em geral, os pacientes apresentam leucocitose e sinais provocados pela falência da MO, como anemia e trombocitopenia. Também são comuns fadiga e perda de peso. Linfoadenopatia e organomegalia são menos frequentes. Quando não tratado o paciente morre, em geral, após alguns meses do diagnóstico devido a infecções ou sangramentos. Mesmo para os pacientes submetidos ao tratamento as taxas de mortalidade são altas, sendo as principais

causas de mortalidade as infecções, sangramentos e a síndrome de lise tumoral (De Lima *et al*., 2016; Saultz & Garzon, 2016; Acharya *et al*., 2018).

Os blastos leucêmicos variam de tamanho, podendo ser menores que os linfócitos ou até mesmo maiores que os monócitos. As células possuem alta relação núcleo / citoplasma, com o núcleo podendo se apresentar de diferentes formas e possuindo vários nucléolos (Figura 1). Além disso, os blastos leucêmicos expressam antígenos encontrados nas células mieloides imaturas saudáveis, como: CD13, CD33 e CD34. Outros antígenos também são expressos, mas estes variam de acordo com o subtipo morfológico do blasto e do seu estágio de diferenciação (Campos *et al*., 1989; Wolach & Stone, 2015).

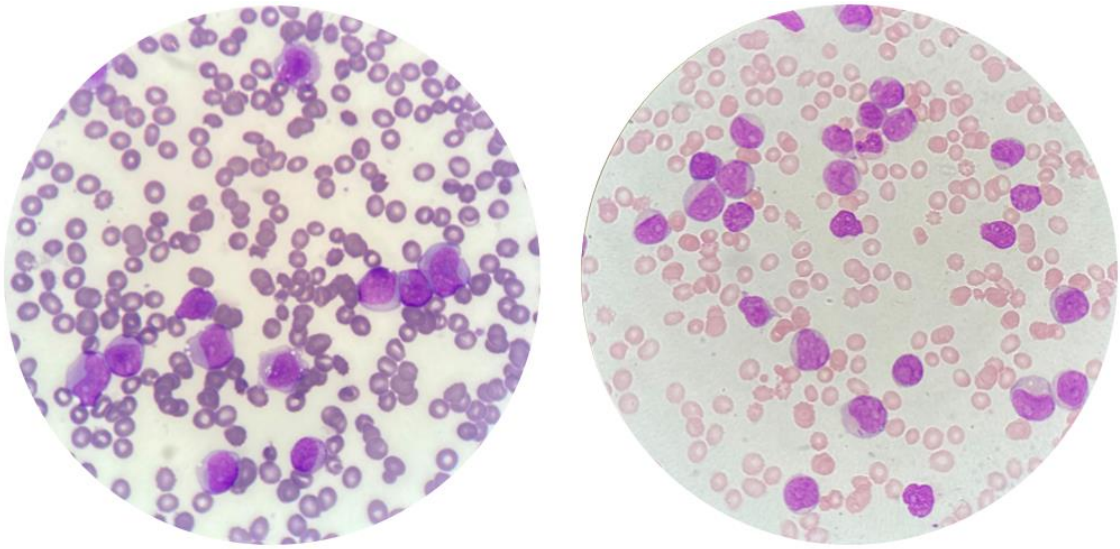

Figura 1: Lâmina de paciente com LMA observada em microscópio óptico. É possível observar o acúmulo de blastos leucêmicos em duas amostras de SP de pacientes com LMA. Ambas as imagens são observadas em um aumento de 100X. Fonte: Próprio autor.

2.1.1 Patogênese

Apesar de ainda não se compreender por completo os processos que levam ao desenvolvimento da LMA, são descritos diferentes fatores de risco

genéticos, físicos e químicos associados a doença. Para os fatores genéticos, além de mutações presentes em genes na linhagem germinativa, síndromes como a síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Patau, síndrome de Shwachman, síndrome de Kostman e síndrome de Li-Fraumeni e doenças como anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia e neurofibromatose estão relacionadas a uma maior probabilidade de desenvolvimento da LMA. Além disso, exposição a benzeno, tratamentos com quimioterápicos, pesticidas, tabagismo, líquidos de embalsamamento, herbicidas e exposição à radiação também estão relacionados a um maior risco de desenvolvimento da doença (Deschler & Lübbert 2006; Ismail *et al*., 2018; Spector *et al*., 2018).

Os avanços nas pesquisas com células tronco e análises genômicas em larga escala melhoraram o entendimento sobre a biologia da doença nas últimas décadas. O perfil genético da LMA possui grande heterogeneidade, com a maioria dos casos ocorrendo devido a mutações que surgem e se acumulam ao longo da vida do paciente ou, em alguns casos, surgindo devido a predisposições genéticas por causa da presença de mutações na linhagem germinativa. Formas herdadas de neoplasias mieloides têm sido associadas a mutações na linhagem germinativa nos genes *ANKRD26, CEBPA, DDX41, ETV6, GATA2, RUNX1* e *SRP72* (Döhner *et al*., 2016; Godley, 2014).

Acredita-se que a LMA se desenvolve a partir de uma célula tronco hematopoiética ou algum progenitor da linhagem mieloide que acumulou mutações ao longo do tempo. As mutações passam a favorecer a expansão clonal de forma desordenada dos blastos malignos imaturos, além de manter a sua capacidade de auto-renovação, dessa forma estas células são capazes de fazer a manutenção do clone leucêmico. Além disso, através de um processo

denominado evolução clonal, as células passam por outros processos de mutação que levam a heterogeneidade cariotípica e molecular da população de células leucêmicas. O que conduz a presença de diferentes populações celulares, clones com diferentes fenótipos, cariótipos e genótipos no mesmo paciente no momento do diagnóstico (Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016; Saultz & Garzon, 2016; Thomas & Majeti, 2017).

Alterações citogenéticas recorrentes ocorrem em 52% dos casos. Tais alterações são derivadas de translocações balanceadas ou inversões. São descritas como precursoras da patogênese de diferentes subtipos de LMA. Por exemplo, translocações balanceadas como t (8;21) e t (15;17) formam as proteínas quiméricas oncogênicas RUNX1-RUNX1T1 e PML-RARA, respectivamente. Tais proteínas induzem a parada da maturação e a proliferação dos blastos e, dessa forma induzem o surgimento do fenótipo leucêmico. No entanto, aproximadamente 50% dos pacientes não apresentam alterações citogenéticas, nestes casos a LMA é classificada como LMA com cariótipo normal (LMA-CN) (Grimwade & Mrózek 2011; Al-issa & Nazha 2016; Zhang *et al*., 2019).

Com a média de cinco mutações recorrentes por genoma, a LMA apresenta um número menor de mutações que a maioria dos outros tipos de câncer. No entanto, diferentes mutações ocorrem de forma recorrente, tais mutações interagem de diferentes formas, ocorrendo uma grande diversidade na sobreposição destas no mesmo clone leucêmico. As diferentes mutações e a diversidade de interações entre elas afetam o fenótipo da doença de diversas formas (Lindsley *et al*., 2015; Arber *et al*., 2016; Short *et al*. 2018). Os principais genes encontrados mutados na LMA e suas respectivas porcentagens de mutação são: *FLT-3* (35%), *NPM1* (30%), *CEBPA* (10%), *KIT* (10%), *DNMT3A*

(20%), IDH1 (5-15%), *IDH2* (10-20%), *NRAS* (15%), *TET2* (5-20%), *ASXL1* (5-15%), *RUNX1* (5-20%) e *TP53* (5-20%) (Döhner *et al*., 2016; Gu & Wei., 2018).

A LMA também pode surgir devido ao tratamento de uma neoplasia anterior, sendo denominada de LMA relacionada ao tratamento (t-LMA). Em torno de 10% dos casos LMA são classificados como t-LMA. Este tipo de LMA surge pela exposição a quimioterápicos citotóxicos ou radiação devido ao tratamento de outra neoplasia antecedente. Acredita-se que os efeitos genotóxicos da quimioterapia sirvam como evento leucemogênico, o que leva ao desenvolvimento da LMA. Em geral, apresenta mutações que levam a piores prognósticos. Em 75% dos pacientes, a t-LMA surge após 5-7 anos da exposição a agentes alquilantes ou radiação, pode ser precedido por síndrome mielodisplásica e na maioria dos casos apresenta alterações nos cromossomos 5 e/ou 7, cariótipo complexo (presença de 3 ou mais alterações citogenéticas) e mutação no gene *TP53* em 37% dos casos (Döhner *et al*,. 2017; Shallis *et al*. 2019; Kuykendall *et al*., 2018; Lindsley *et al*., 2015).

2.1.2 Epidemiologia

A LMA pode surgir em pacientes de qualquer idade, representando de 15-20% dos casos de leucemia aguda na infância, sendo responsável por 30% dos óbitos por leucemia nessa faixa etária. No entanto, é o tipo mais comum de leucemia em adultos, sendo responsável por 80% dos casos. Causa 62% das mortes por leucemia e menos de 3% das mortes de todos os tipos de câncer. Além disso, é o quinto tipo de câncer com pior taxa de SG (De Lima *et al*. 2016; Shallis *et al*. 2019). Ocorre predominantemente em pessoas acima dos 65 anos, grupo que ainda apresenta baixas taxas de sobrevivência. Em 1980 a sobrevida global prolongada de idosos com LMA era de apenas 1-2%, e atualmente está em

torno de 20% (Burnett, 2012).

A incidência da LMA varia de acordo com diferentes fatores, como: idade, gênero e etnia. De acordo com a idade, a incidência aumenta de 1,3 casos a cada 100.000 habitantes para pessoas abaixo de 65 anos, para 12,2 por 100.000 habitantes para pessoas acima dessa faixa etária. Além disso, comparados aos jovens, os pacientes idosos possuem maior número de alterações citogenéticas, menores taxas de SG e maior taxa de recidiva (Acharya *et al*., 2018; Lima *et al*. 2016). Ao se comparar os gêneros, homens têm de 1,2-1,6 mais chances de desenvolver LMA que mulheres. Iane e colaboradores (2014) relataram que afro-americanos possuem menor incidência de LMA com t (8;21), inv (16) ou t (16;16) que caucasianos (0.07 vs. 0.12 por 100.000 habitantes, respectivamente). Além disso, a estimativa de incidência de LMA para europeus e americanos é duas vezes maior que a incidência estimada para japoneses e chineses (Wang *et al*., 2012; Khwaja *et al*., 2016).

Nos Estados Unidos, estima-se uma incidência de 4,3 novos casos a cada 100.000 habitantes e 2,2 mortes a cada 100.000 habitantes por ano (Shallis *et al*., 2019). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) agrupa os dados referentes a neoplasias hematológicas em uma única categoria denominada leucemias. Segundo o instituto, o número de novos casos de leucemia no país será de 5.920 casos em homens e de 4.890 casos em mulheres, para cada ano do triênio 2020-2022. O que corresponde a 5,67 e 4,56 casos a cada 100.000 homens e 4,56 casos para cada 100.000 mulheres, por ano. Para o estado de Pernambuco, foi estimado 480 novos casos de leucemia para o ano de 2021 (INCA, 2020).

2.1.3 Classificação

Em 1970 o consórcio Franco-Americano-Britânico propôs uma classificação para a LMA. Baseado em características imunofenotípicas e citoquímicas os pacientes com LMA eram classificados em 8 subtipos distintos (MO a M7) (Döhner *et al*. 2010). No entanto, devido ao avanço das técnicas expressão gênica e ao sequenciamento de nova geração, novos conhecimentos foram obtidos e, por isso, em 2002 a Organização mundial de Saúde (OMS) propôs um novo sistema de classificação. Baseado em características clínicas, morfologia, imunofenotipagem, citogenética e genética molecular para definir subgrupos de LMA com diferentes significados clínicos. Recebendo atualizações em 2008 e 2016. Nas últimas atualizações, um número crescente de subtipos de LMA foram criadas a partir de anormalidades citogenéticas e moleculares subjacentes as já bem estabelecidas (Tabela 1) (Arber *et al*., 2016).

Tabela 1: Classificação da LMA de 2016 da OMS

Leucemia Mieloide Aguda e Neoplasias de Células Precursoras Relacionadas
- LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t (8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
LMA com inv (16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
LPA com PML-RARA
LMA com t (9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
LMA com t (6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
LMA com inv (3)(q21.3q26.2) ou t (3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
LMA (megacarioblástica) com t (1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1
LMA com mutação *NPM1*
LMA com mutação bialélica de *CEBPA*
Entidade provisória: LMA com mutação *RUNX1*

- LMA com alterações mielodisplásicas relacionadas
- Neoplasia Mieloides relacionadas com terapia
-LMA não classificáveis
LMA com mínima diferenciação
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia Mielomonocítica Aguda
Leucemia Monoblástica e Leucemia Monocítica Aguda
Leucemia Eritroide Pura
Leucemia Megacarioblástica Aguda
Leucemia Basofílica Aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
- Sarcoma Mieloide
- Proliferações mieloides relacionadas com síndrome de Down
Mielopoese anormal transitória (MAT)
Leucemia mieloide associada à síndrome de Down
- Neoplasias de células dendríticas plasmocitóides blásticas

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

Em 2012, a European LeukemiaNet (ELN) publicou recomendações para o diagnóstico e tratamento da LMA. Tais recomendações foram amplamente adotadas na prática clínica, em triagens de pacientes e em agências regulatórias. Dentre as recomendações, a ELN categorizou os pacientes em três grupos de risco genético dependendo da presença de determinadas alterações cromossômicas e mutações somáticas (Tabela 2) (Döhner *et al*., 2017).

Tabela 2: Estratificação por risco genético de pacientes com LMA da ELN 2017.

Categoria de risco	Anormalidade genética
Favorável	t (8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1* inv (16)(p13.1q22) ou t (16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11* Mutado *NPM1* sem *FLT3*-ITD ou com FLT3-ITD^{baixo}† Mutação bialelica no *CEBPA*
Intermediário	NPM1 mutado e FLT3-ITD^{alto}† *NPM1* selvagem com *FLT3*-ITD ou com FLT3-ITD^{baixo}† (sem lesões genéticas de risco adverso) T (9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A* Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214* t(v;11q23.3); rearranjo *KMT2A* t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1* inv (3)(q21.3q26.2) ou t (3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2,MECOM(EVI1)* -5 ou del (5q); -7; -17/abn(17p) Cariotipo complexo, cariótipo monossomal || *NPM1* selvagem e *FLT3*-ITD^{alto}† *RUNX1* mutado *ASXL1* mutado *TP53* mutado

Adaptado de: Döhner *et al*., 2017.

2.1.4 Diagnóstico e prognóstico

O diagnóstico é realizado através do exame do esfregaço do SP e da MO para se avaliar o acúmulo de blastos leucêmicos nestes tecidos. Além disso, imunofenotipagem por citometria de fluxo ou citoquímica, biopsia da MO, e análises fenotípicas e genéticas (cariótipo e mutações somáticas) são utilizadas

para se distinguir a LMA de outras leucemias, diagnóstico, classificação e estratificação de risco dos pacientes com suspeita de LMA (Khwaja *et al*. 2016).

Para ser diagnosticado com LMA o paciente deve apresentar 20% ou mais de blastos mieloides na MO ou SP. Recomenda-se a contagem de pelo menos 200 leucócitos em esfregaços de sangue e 500 células nucleadas em esfregaços de medula, com os últimos contendo espículas para avaliação da celularidade da MO. Além disso, a análise citogenética de pacientes com suspeita de LMA é obrigatória, onde são analisadas no mínimo 20 células em metáfase. O diagnóstico também pode ser realizado a partir da identificação das alterações citogenéticas t (8; 21), inv (16) ou t (15; 17). Nestes casos o diagnóstico é realizado independente da presença de 20% de blastos na MO, pois a presença de tais alterações são critérios suficientes para se determinar o diagnóstico (Döhner *et al*. 2010; Abdul- Kouchkovsky & Hay 2016; Acharya *et al*. 2018).

A avaliação prognóstica é essencial para o tratamento da LMA, pois orienta a escolha do tratamento, entre uma terapia de indução padrão ou alternativa, na quimioterapia de consolidação ou no transplante de células tronco ou até mesmo na indicação do paciente para tratamentos que estão em estágio de investigação clínica. O prognóstico é feito a partir de fatores relacionados ao paciente (que prediz a mortalidade relacionada ao tratamento) e a fatores específicos do clone leucêmico (que prediz a resistência ao tratamento) e determinam o manejo do paciente (Othus *et al*., 2014).

Os fatores relacionados ao paciente dizem respeito a capacidade que o mesmo tem em receber a terapia citotóxica adequada, porém essa capacidade pode ser afetada por diferentes causas, como: a idade do paciente, baixo status de desempenho e a presença de comorbidades. Para os fatores relacionados à

doença, alterações citogenéticas e moleculares específicas são classificadas como fatores de bom ou ruim prognóstico a depender dos tipos de mutações presentes no clone leucêmico. Alterações citogenéticas como t (8; 21) (q22; q22), t (15; 17) (q22; q12) e inv (16) (p13.1; q22) apresentam melhor prognóstico, enquanto alterações nos cromossomos 5, 7 e cariótipo complexo estão relacionadas a piores prognósticos. Além disso, alta porcentagem de glóbulos brancos no sangue, existência de síndrome mielodisplásica prévia e a utilização de terapia citotóxica como tratamento para outra doença anterior também são critérios de pior prognóstico (Döhner *et al*., 2016; Wolach., 2015).

Embora tenham ocorrido avanços nos resultados de pacientes jovens o prognóstico para idosos permanece substancialmente insatisfatório. Pois, mesmo com as atualizações e melhorias nos tratamentos de suporte, 70% dos pacientes acima de 65 anos morrem dentro de um ano após o diagnóstico. Pacientes abaixo dos 40 anos tem uma estimativa de SG de 5 anos de 58,2%, diminuindo consideravelmente a cada década a mais de vida, chegando a apenas 0,4% em pacientes acima de 85 anos (Shallis *et al*. 2019).

2.1.5 Tratamento

Até o final da primeira metade do século XX a LMA era uma doença incurável. As primeiras tentativas de tratamento para o câncer com quimioterápicos foram realizadas em pacientes com leucemia, isso ocorreu devido a característica liquida do tecido sanguíneo, pois era menos invasivo a coleta do sangue do paciente em relação a coleta de um tecido sólido, além disso, é de fácil mensuração a contagem do número de glóbulos brancos (Farber 1948; Miller 2006). No entanto, apesar da abrangente literatura científica produzida ao longo de décadas de pesquisa, a base do tratamento da LMA permanece a mesma

desde 1970 e os resultados permanecem insatisfatórios, com a maioria dos pacientes entrando em recaída e morrendo. Com a utilização da quimioterapia padrão, a sobrevida prolongada dos pacientes é alcançada em 35-45% das pessoas com menos de 60 anos e em 10-15% dos pacientes acima desta faixa etária (Döhner *et al*. 2017).

Como muitos pacientes não toleram altas doses de quimioterápicos, primeiro é avaliado se o paciente é considerado apto para receber a quimioterapia de indução intensiva. Por isso, são utilizados diferentes sistemas de pontuação que avaliam os fatores relacionados ao paciente e a doença para se determinar se o paciente será submetido ao tratamento intensivo ou a um tratamento alternativo. Ao ser considerado apto, o paciente é submetido a um tratamento intensivo realizado em duas etapas chamadas de terapia de indução e a terapia de consolidação (Webster *et al*. 2017).

A terapia de indução objetiva alcançar a remissão completa (RC) e a terapia de consolidação objetiva matar os clones leucêmicos restantes (chamada de LMA refratária) para evitar a recidiva da doença (Webster *et al*. 2017; Estey 2018). A obtenção da RC ocorre pela avaliação da MO que deve apresentar menos 5% de blastos, ausência de blastos circulantes e / ou com bastões de Auer, com a recuperação em quantidades adequadas dos componentes do sangue (neutrofilos > 1000 / µL e plaquetas > 100 000 / µL), além de nenhuma evidência da doença em outros tecidos (Short *et al*., 2018).

Chamada de regime 7+3, na terapia de indução o paciente recebe a administração de antraciclina durante 3 dias seguida da administração de citarabina (Ara-C) por 7 dias. A dose e esquema típicos incluem daunorrubicina (60 ou 90 mg / m^2 nos dias 1, 2 e 3) ou idarubicina (10–12 mg / m^2 nos dias 1, 2 e

3) administrados com sete dias de infusão contínua de Ara-C (100 mg / m^2) diariamente por uma semana (dias 1 a 7). 65-73% dos pacientes jovens com LMA *de novo* obtêm RC, enquanto apenas 38-62% dos pacientes idosos alcançam este resultado (Cheson *et al*., 2003; Webster *et al*. 2017).

Mesmo após a obtenção da RC, a doença residual mínima persiste, o que levará a uma recaída do paciente caso o tratamento seja interrompido. Por isso, a terapia de indução deve ser seguida pela terapia de consolidação. A terapia de consolidação varia entre os grupos de risco e a idade dos pacientes, sendo realizada com altas doses de Ara-C ou com a administração em conjunto de diferentes agentes quimioterápicos seguido do transplante autólogo ou alogênico de células tronco hematopoiéticas. A escolha da estratégia da terapia de consolidação dependendo de diferentes fatores, como: o tipo de leucemia, aptidão do paciente e disponibilidade de doador de células tronco (Saultz & Garzon 2016).

Para os pacientes que não toleram a quimioterapia intensiva faltam opções de tratamento eficazes, com o tratamento se limitando a cuidados de suporte, tratamento de baixa intensidade ou utilização de medicamentos que estão em fase de investigação clínica. O tratamento de baixa intensidade é realizado com a administração com baixas concentrações de Ara-C ou com agentes hipometilantes. Em geral, é tolerada e produz 15-25% de RC. No entanto, a média de sobrevida é de apenas 5-6 meses. Azacitabina e decitabina induzem taxas de RC 16-21% e sobrevida de 6-9 meses em pacientes idosos com recidiva. Existem diferentes opções de tratamento para pacientes com segunda ou terceira recidiva, estes apresentam taxas de RC em torno de 20% e sobrevida média de 3 meses. Em adultos com a faixa etária entre 16 e 49 anos que não tenham recebido transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, uma segunda remissão

é obtida em aproximadamente 55% dos casos (Roboz *et al*. 2014; Döhner *et al*., 2017; Webster *et al*., 2017; Acharya *et al*., 2018).

2.1.6 Variantes genéticas e a LMA

Nas últimas décadas, alterações cromossômicas estruturais juntamente com mutações somáticas adquiridas foram identificadas em pacientes com LMA e atualmente são utilizadas como critério de classificação para se definir subgrupos distintos de pacientes (Arber *et al*., 2016). No entanto, apesar de sua evidente importância, a contribuição de fatores germinativos sempre foi subestimada na patogênese e evolução clonal desta doença. Embora evidências recentes tenham demonstrado que variantes genéticas hereditárias sejam relevantes para a patogênese de neoplasias mieloides, incluindo a LMA (Tapper *et al*., 2015; Drokow *et al*., 2020; Gunaratna *et al*., 2019).

Zhu e colaboradores (2018) identificaram que que SNPs presentes nos genes *NME2, E2F1* e *RRM2* estão associados ao aumento a resistência a quimioterapia em pacientes com LMA. Além disso, também foi observado que a combinação entre SNPs presentes nos genes *E2F1* e *RRM2* diminuíram a taxas de RC dos pacientes. Também foi analisado o impacto dos polimorfismos CYBA, CA2 e NCF4 presentes no *NADPH oxidase* em pacientes adultos com LMA. Foi observado uma associação entre os alelos variantes NCF4 e RAC2 com maiores taxas de RC, enquanto a variante CYBA apresentou, no modelo recessivo, menor taxa de sobrevida global (Vericat et al., 2018).

Embora o gene *TP53* seja encontrado mutado em mais de 50% dos tumores sólidos, a taxa de mutação deste gene é baixa em leucemias, ficando em torno de 15%. No entanto, polimorfismos neste gene podem alterar a sua funcionalidade e impactar a patologia de diferentes neoplasias (Whibley *et al*.,

2019). Drokow e colaboradores (2020) identificaram que o polimorfismo Arg72Pro (rs1042522) presente no gene *TP53* está associado com o risco de diferentes leucemias, incluindo a LMA, podendo influenciar seu desenvolvimento em diferentes populações.

2.2 O gene *TP53*

Codificada pelo gene *TP53*, a proteína p53 foi primeiro descrita como uma oncoproteína superexpressa no câncer por ser encontrada associada ao antígeno T do simian vírus 40 em células transformadas (Lane & Crawford, 1979). No entanto, estudos posteriores identificaram a proteína como uma supressora tumoral por inibir o crescimento e a transformação oncogênica de células em cultura (Finlay *et al*., 1989). Sendo atualmente reconhecida como o principal agente da fisiologia celular que previne o desenvolvimento de neoplasias, também chamado de ´´guardiã do genoma`` (Joerger & Fersht, 2016).

Desde a sua descoberta em 1979 (Lane & Crawford, 1979), a p53 tem sido o objeto central de estudo de diferentes áreas do campo biológico, especialmente na área oncológica, devido a gama de funções celulares da qual a proteína participa (Soussi & Wilman, 2015). O que resultou em uma bibliografia extensa sobre a p53. No banco de dados PubMed, a busca com a palavra-chave p53 gera mais de 104.913 resultados (NCBI, 2021). No entanto, apesar da abrangente literatura existente, o entendimento da extensão da sua participação nas funções celulares e como ela induz tais respostas não está completamente esclarecido (Drokow *et al*., 2020).

Representada por 3 genes (*TP53, TP63* e *TP73*), a família p53 é encontrada em diferentes grupos do reino animal (Joerger & Fersht, 2016). Além

disso, algumas espécies aumentaram a dosagem gênica da *TP53* por meio de retrogenes. Por exemplo, os elefantes possuem até 20 retrogenes da *TP53*, o que pode ser uma das explicações para um animal de grande porte que possui uma longevidade considerável não estar sujeito ao alto risco de desenvolvimento de câncer (Abegglen *et al*., 2015).

2.2.1 Estrutura

O gene *TP53* humano está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1). Possui 13 éxons, sendo o primeiro não codificador e 12 íntrons. Além disso, os genes *Hp53Int1* e *WRAP53* se encontram no exon-1 / intron-1 (Figura 2 A). A p53 humana possui 393 aminoácidos, sendo ativa na forma de um homotetrâmero (Figura 2 B). Apresenta 3 regiões distintas que são constituídas por 6 domínios. A região N-terminal é formada por 2 domínios de transativação intrinsecamente desordenados e 1 domínio rico em prolina. A região central da sequência de aminoácidos da proteína forma o domínio de ligação ao DNA e a região C-terminal possui os domínios de oligomerização e de regulação negativa (Joruiz & Bourdon, 2016; Lamb & Crawford, 1986).

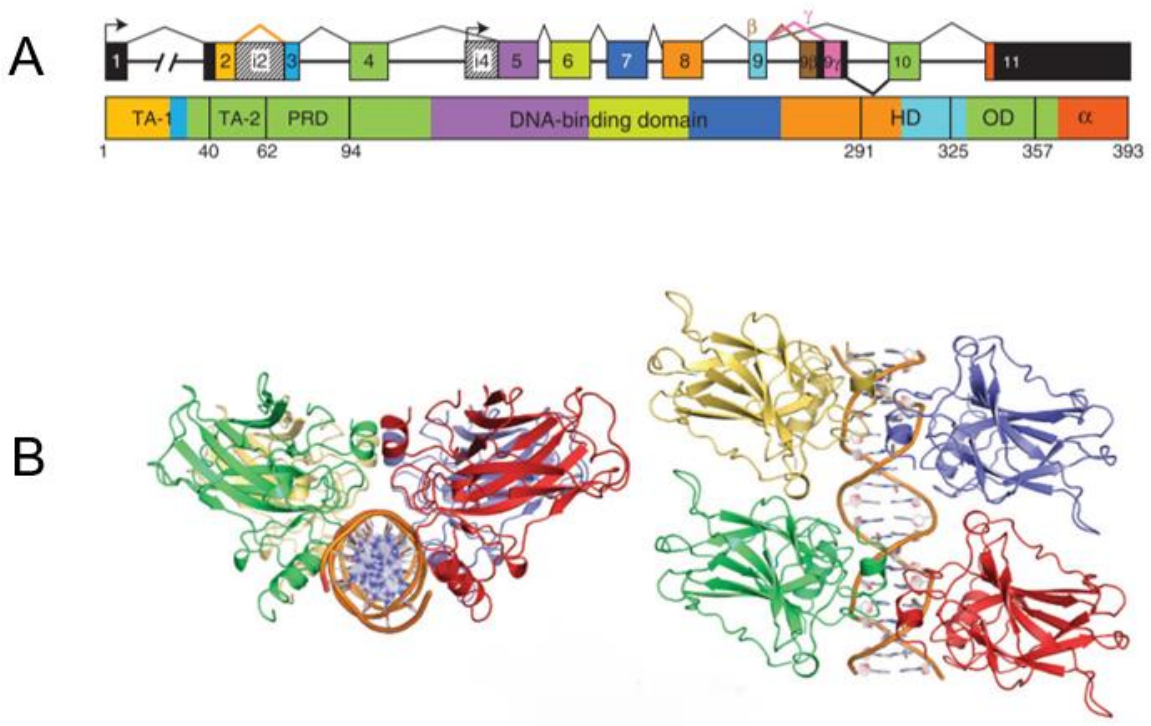

Figura 2: Estrutura da p53. A – Estrutura linear do gene (superior) e proteica (inferior) da p53. B – Modelo 3d de um homotetrâmero formado por proteínas p53 ligadas a duplas fita de DNA. Fonte: Joroiz & Bourden., 2015; Joerger & Fersht., 2016.

2.2.2 Função

Em condições fisiológicas homeostáticas, a p53 é mantida em baixas concentrações celulares. Porém, em condições de estresse (dano ao DNA, ativação oncogênica, estresse ribossomal e hipóxia) a p53 é estabilizada por meio de modificações pós-traducionais, aumentando sua concentração e consequentemente ativando diferentes funções celulares, como: reparo do DNA, parada do ciclo celular, senescência, apoptose e repressão da angiogênese. Além disso, a p53 participa de outras funções celulares denominadas ``funções não canônicas´´, como: autofagia, regulador do metabolismo, repressor da pluripotência e plasticidade celular, ferroptose, entre muitas outras (Figura 3) (Kastenhuber & Lowe, 2017).

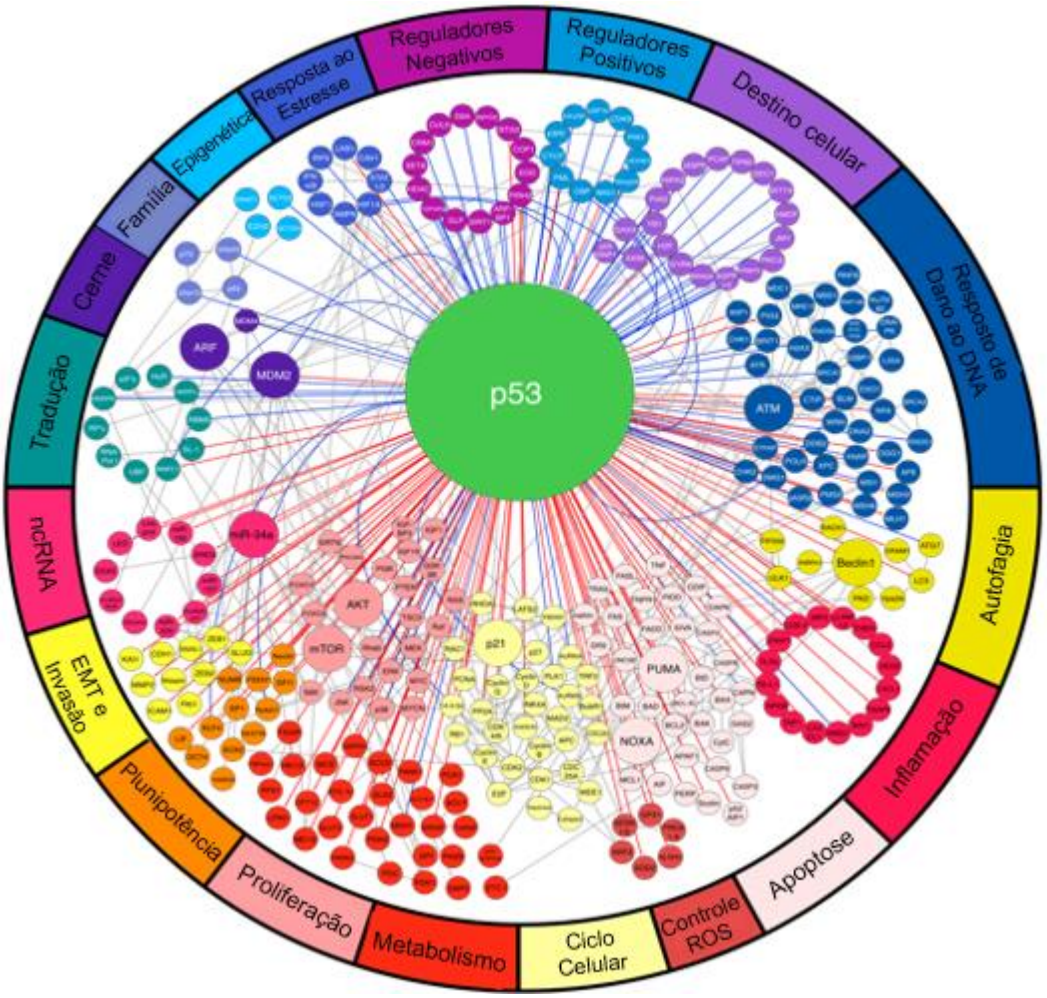

Figura 3: Funções celulares que a p53 participa. É observada a gama de funções ´´canônicas`` e ´´não canônicas`` das quais a proteína p53 participa. Cada círculo representa um gene ao qual a p53 interage. Fonte: Kasenhuber & Lowe., 2017.

Para induzir tais respostas a proteína atua como fator de transcrição induzindo a transcrição de subconjuntos de genes específicos ou por meio de interações proteína-proteína no citoplasma. Por exemplo, ao ocorrer dano ao DNA, cinases responsivas ao dano no DNA fosforilam a p53 que, então, induz a expressão de genes que fazem parte dos componentes da maquinaria de reparo ao DNA, parada do ciclo celular, senescência e/ou apoptose. Dessa forma, se reduz o risco de propagação da mutação para as células filhas após a divisão celular (Joerger & Fersht, 2016; Fischer, 2017).

Das diferentes funções celulares das quais a p53 participa, a maior parte são dependentes da sua função como fator de transcrição. A proteína se liga a regiões específicas do genoma chamadas de elementos responsivos à p53, tais regiões são sequências consenso que possuem duas sequências de 10 pb RRRCWWGYYY (R = A / G, W = A / T, Y = C / T) separadas por DNA espaçador de 0 a 13 pb. Estes elementos responsivos ao DNA são encontrados principalmente na região promotora dos genes, porém também são encontradas nas regiões intrônicas e mais raramente em éxons (Wei *et al*., 2006; El-Deiry *et al*., 1992).

As respostas celulares induzidas pela p53 são notavelmente flexíveis, diferente do estado ligado ou desligado, a intensidade da resposta se altera a partir de uma série de variáveis, tais como: o tipo de celular, seu estado de diferenciação, modificações pós-traducionais, condições de estresse, sinais ambientais colaborativos e polimorfismos (Kastenhuber & Lowe 2017; Joerger & Fersht, 2016).

2.2.3 Regulação

As concentrações celulares da p53 estão sob o controle de dois reguladores negativos, MDM2 e MDMX (também chamada de MDM4). Por meio de um mecanismo de feedback negativo a p53 induz a expressão gene *MDM2* como fator de transcrição. Ao ser transcrito, a proteína MDM2 atua como uma ubiquitina ligase E3 da p53, o que a conduz para a sua degradação no proteossoma 26S. Enquanto a MDMX modula a atividade da MDM2 por meio da formação de heterodímeros que inibem a sua autoubiquitinação. Além disso, outras proteínas também foram identificadas como ubiquitinas ligases E3 que tem

a p53 como alvo: Trim24, Pirh2, Topors, Carps e Msl2. (Tail & Benchomol, 2009; Allton *et al*., 2009).

Existem mais de 50 modificações pós tradicionais que a p53 pode sofrer. Modificações, como: fosforilação, acetilação, mono- e di-metilação, glicosilação, ubiquitinação, sumoilação e poli-ribosilação podem ocorrer em diferentes regiões e combinações ao longo da proteína. Tais modificações alteram a estabilidade da proteína, além da sua afinidade por interações proteína-proteína no citoplasma e por genes alvos específicos. Por exemplo, a fosforilação de uma serina localizada no aminoácido número 46 estimula apoptose. Além disso, um tipo de modificação pode aumentar a afinidade da proteína para receber outros tipos de modificações, o que ocasiona níveis a mais de regulação (Meek & Anderson, 2009; Kumari *et al*., 2014).

2.2.4 Isoformas

Em humanos são descritos nove RNAm transcritos a partir do gene *TP53* que codificam doze isoformas da proteína p53. Estas isoformas são formadas a partir de inícios alternativos de transcrição e de tradução, além de splicing alternativo. A primeira isoforma descoberta possui 393 aminoácidos, sendo chamada de p53a, FLp53, p53 canônico e TAp53a (a partir de agora chamada de p53). Além disso, ainda existem as isoformas p53b (ou p53i9), p53g, D40p53a (ou DNp53, p44 ou p47), D40p53b, D40p53g, D133p53a, D133p53b, D133p53g, D160p53a, D160p53b e D160p53g (Joruiz & Bourdon, 2016). Alguns trabalhos têm identificado alterações na expressão da isoformas da p53 entre indivíduos saudáveis e pacientes oncológicos. O que indica um nível a mais de complexidade da participação do gene *TP53* na patogênese de neoplasias (Bischof *et al*., 2019; Bischof *et al*., 2018; Kiejda *et al*., 2014).

2.2.5 Mutações

Reconhecido como o principal supressor tumoral, o *TP53* é o gene com maior frequência mutacional no câncer, com aproximadamente metade dos tumores apresentando ao menos uma mutação no gene. A inativação da p53 ocorre por diferentes tipos de mutações ou por alterações em uma de suas vias regulatórias (Joerger & Fersht, 2016). A frequência e distribuição das mutações no gene *TP53* variam significativamente entre os tipos de câncer, porém na maior parte das neoplasias mutações sem sentido apresentam maior frequência (Kastenhuber & Lowe 2017). Além disso, algumas mutações alteram a p53 de forma que esta passa a atuar como uma oncoproteína a partir de mutações com ganho de função (Soussi & Wilman, 2015; Bykov *et al.,* 2017).

2.2.6 Polimorfismos

Enquanto mutações causam alterações significativas nas funções da p53, apenas uma pequena parte dos polimorfismos existentes no gene modulam a sua atividade. No entanto, por ser um supressor tumoral, polimorfismos que modulam a atividade da p53 podem afetar o risco ao desenvolvimento de câncer. Mais de 90% dos polimorfismos presentes no gene estão em sequências não codificantes e dos 19 polimorfismos presentes em éxons, 8 determinam códons sinônimos. Destes, apenas as variantes p53 Pro47Ser (rs1800371) e Arg72Pro demonstraram ser moduladores da atividade da p53 (Whibley *et al*., 2009).

O Pro47Ser é relatado apenas em populações africanas com uma frequência de 5% (Bosco *et al*., 1993). Esta variante diminui a fosforilação do resíduo adjacentes de serina (S46), que é um importante sítio de interação com proteínas pró-apoptóticas p38 e HIPK2, o que diminui as taxas de ativação de apoptose e, dessa forma aumentam o risco de câncer. Enquanto o polimorfismo

Arg72Pro é a variante mais estudada, com uma bibliografia extensa e, por muitas vezes, contraditória (Whibley *et al*., 2009; Kodal *et al*., 2017; Drokow *et al*., 2020).

2.2.7 O polimorfismo Arg72Pro

O polimorfismo *TP53* Arg72Pro (G215C) ocorre pela presença de uma arginina ou de uma prolina no aminoácido de número 72 da proteína, formando as variantes p53-Arg72 e p53-Pro72 que são amplamente distribuídas na população. Este polimorfismo se encontra no domínio rico em prolina da proteína, região que é descrita como participante da ativação da função apoptótica da p53. O polimorfismo Arg72Pro ganhou destaque na literatura cientifica a partir da descoberta que a oncoproteína E6 do papilomavírus humano (HPV) induzia a degradação da p53 de forma mais intensa na proteína com a variante Arg72 e que pacientes homozigotos para esta variante eram até sete vezes mais susceptíveis a tumorigênese associada ao HPV que pacientes heterozigotos (Storey *et al*., 1998). A partir destas observações um grande número de estudos foi realizado para se analisar a associação deste polimorfismo com o câncer (Whibley *et al*., 2009).

O SNP Arg72Pro, demonstra ter passado pelo processo de seleção natural. O que indica que a p53 possui funções conservadas, além da supressão tumoral (Zhao et al.,2018). Diferentes trabalhos analisaram este polimorfismo e demonstraram diferenças bioquímicas e funcionais na proteína p53 dependendo da forma polimórfica encontrada no códon 72, como: variação na migração no gel de SDS-page, estabilidade proteica e diferença na intensidade da interação com fatores de transcrição. Tais diferenças modulam os níveis de expressão dos genes regulados pela p53 e, consequentemente, alteram a intensidade da resposta celular induzida pela proteína (Matlashewski *et al*., 1987; Thomas *et al*.,

1999; Wibley *et al*., 2009). (Dumont *et al*., 2003; Pim & Banks, 2004; Jeong *et al*., 2010). Além disso, é hipotetizado que o polimorfismo Arg72Pro module o balanço entre a indução da morte celular através da vigilância tumoral e a regulação das células tronco, que são importantes modulares para a longevidade (Zhao et al., 2018).

Heemst e colaboradores (2005), em um estudo com pessoas acima dos 85 anos, relataram que indivíduos homozigotos para a variante Pro72 tiveram maior sobrevida, embora a mortalidade por câncer fosse 2,3 vezes maior. Da mesma forma, um estudo realizado com uma coorte dinamarquesa observou uma mortalidade menor para indivíduos Pro / Pro e Pro / Arg versus Arg / Arg. Este estudo também encontrou uma associação entre o aumento da sobrevida após o diagnóstico de qualquer câncer em indivíduos Pro / Pro em relação a indivíduos Arg / Arg (Orsted et al., 2007).

As variantes presentes no códon 72 podem causar mudanças conformacionais na proteína, resultando em um recrutamento diferencial de outras proteínas que participam do complexo transcricional e, dessa forma, alteram a intensidade das respostas celulares das quais a p53 participa. Por exemplo, a variante Pro72 tem maior interação com os fatores de transcrição TAFII32 e TAFII70 do que a variante Arg72 (Jeong *et al*., 2010; Thomas *et al*., 1999).

A importância deste polimorfismo está associada, em especial, a função moduladora de apoptose da proteína, com o alelo Arg72 possuindo maior atividade apoptótica em relação ao alelo Pro72 (Dumont *et al*., 2003; Pim & Banks, 2004). Corroborando esta hipótese, vários trabalhos indicam a associação do polimorfismo Arg72Pro com o risco de desenvolvimento de câncer, incluindo

câncer colorretal, bexiga, pulmão, estomago, pancreático, entre outros (Lima et a., 2006; Jiang *et al*.,2010; Qiao & Hu, 2013l). No entanto, pouco se sabe sobre o impacto destas variantes polimórficas em neoplasias hematopoiéticas, especialmente em pacientes com LMA (Bezerra *et al*., 2017).

Embora a maioria dos trabalhos descrevam o alelo Pro72 como um fator de mau prognóstico, esta variante é mais eficiente na ativação dos genes de reparo e parada do ciclo celular (Pim & banks, 2004; Siddique & Sabapathy, 2006). Guanaratna e colaboradores (2019) relataram que animais homozigotos para p53-Arg72 tiveram significativamente maior incidência de tumores mamários induzidos em dois diferentes modelos animais em relação a p53-Pro72. Além disso, as análises também demonstraram que as glândulas mamárias dos animais p53-Arg72 tiveram maior desenvolvimento de fenótipo secretor associado a senescência com influxo de macrófagos pró-inflamatórios, resultando em inflamação protumorigênica crônica. Com isso, os autores concluíram que a variante p53-Arg72 aumentou a suscetibilidade à tumorigênese mamária por meio da inflamação crônica.

O estudo realizado por Ellis e colaboradores (2018) sugere que a interação entre o polimorfismo *TP53* Arg72Pro e a variante *MDM2* SNP309 pode modular a resposta a terapia genotóxica e aumentar o risco de t-LMA Também foi relatado que individuos que possuem o alelo Pro2 apresentam menor frequência de mutações no *TP53* em diferentes tipos de tumores não hematológicos humanos (Lind *et al*. 2007). Além disso, Bezerra e colaboradores (2017) relataram que o genótipo *TP53* Pro / Pro foi associado com maior risco leucemogênico e desfecho favorável em pacientes com LMA tratados com terapia convencional,

particularmente aqueles designados para o grupo de risco citogenético intermediário.

Embora alguns trabalhos tenham descrito uma associação existente entre o polimorfismo Arg72Pro e a LMA (Drokow *et al*., 2020; Bezerra el al., 2016), não existem analises funcionais sobre o impacto deste polimorfismo com a doença. Por isso, se torna importante analisar o papel funcional do polimorfismo Arg72Pro na LMA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto do polimorfismo *TP53* Arg72Pro em linhagem celular de LMA frente as taxas de proliferação e susceptibilidade a apoptose induzida por drogas.

3.2 Objetivos específicos

1. Analisar as taxas de proliferação celular entre os grupos de células expressando as variantes polimórficas Arg e Pro 72 da proteína p53.
2. Analisar a sensibilidade aos quimioterápicos citarabina e trióxido de arsênio entre os grupos de células expressando as variantes polimórficas Arg e Pro 72 da proteína p53.

4 Material e Métodos

4.1 Subclonagem

Diferentes plasmídeos GFP-p53 (addgene) contendo o cDNA do gene *TP53* com as variantes Arg72 ou Pro72 foram gentilmente doados pelo professor, Doutor Luiz Gonzaga Tone (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP). Tais plasmídeos foram submetidos a digestão enzimática com as enzimas de restrição NheI e BamHI. Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% com o produto da digestão, onde foi observado o fragmento correspondente ao cDNA do gene *TP53* de tamanho esperado de 1242 pares de base (pb). O fragmento de DNA foi purificado utilizando o kit EasyPure® Quick Gel Extraction Kit (TransGen Biotech Co) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA obtido após a purificação foi utilizado para se realizar a subclonagem no vetor de expressão.

O vetor de expressão utilizado neste trabalho foi o lentivetor alto inativante pCDH1-MCS1-EF1-GFP-Puro (pMEG) (CD713B-1; System Biosciences) (Figura 4). O pMEG foi submetido a digestão enzimática com as enzimas NheI e BamHI e, em seguida foi realizada a subclonagem do inserto a jusante do promotor MSCV no vetor de expressão. Para se realizar a subclonagem foi utilizado o fragmento de cDNA da p53-Arg72 ou Pro72 purificado e o vetor linearizado pMEG na proporção 7:3 inserto / vetor utilizando a enzima T4 ligase.

Em seguida, foi realizada a transformação de bactérias competentes DH5α, através de choque térmico, com o produto da subclonagem. Ao final da transformação as bactérias foram plaqueadas em placas de petri contendo meio Luria Bertani, agar e o antibiótico ampicilina e deixadas na estufa a 37^0 C *over-nigth* (Sambrook., 1989). Após isso, foram selecionadas 10 colônias que foram

utilizadas para se realizar uma miniprep utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizada a digestão enzimática do produto da miniprep para confirmar a subclonagem do gene *TP53* no vetor de expressão pMEG.

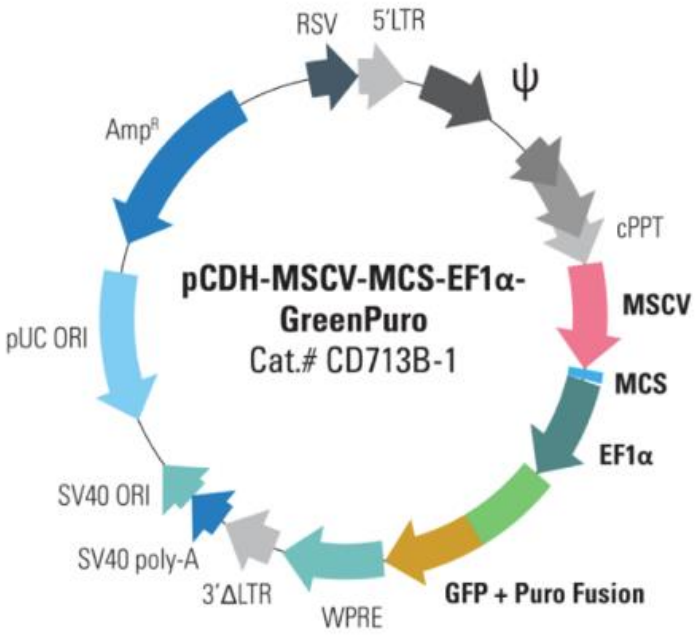

Figura 4: Estrutura do plasmídeo de expressão pMEG.

4.2 Sequenciamento

Os plasmídeos pMEG p53-Arg 72 (pMEG-Arg 72) e pMEG p53-Pro 72 (pMEG-Pro 72) foram sequenciados para se confirmar a presença do polimorfismo Arg72Pro. Foi realizado um sequenciamento de Sanger em um sequenciador genético modelo 3500 XL Genetic Analyzer (Applied BioSystems) disponível no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (NPT-CPqAM / FIOCRUZ).

Os reagentes utilizados para se realizar a reação de sequenciamento estão listados na tabela 3. A reação ocorreu a um volume final de 10 µl, onde cada plasmídeo foi sequenciado em ambas as direções se obtendo as sequencias

referentes a fita molde e complementar. Os primers utilizados foram o *TP53* cDNA Foward (ATGGAGGAGCCGCAGTCAG) e reverse (AGACCATCGCTATCTGAGCAGC) que geraram um produto de sequenciamento do tamanho de 542pb. A análise do sequenciamento foi realizada através do software ApE (A plamid Editor).

Tabela 3: Concentrações dos reagentes utilizados em cada reação de sequenciamento.

Reagente	**Volume (µl)**
Plasmídeo (100-300 ng)	5,0
Tampão de sequenciamento 5x	2,0
BigDye premix	0,5
Primer (3,2 pmol)	1,0
Água ultrapura	1,5

4.3 Cultivo celular

Para analisar o papel do polimorfismo Arg72Pro na LMA foram utilizadas as células de LMA da linhagem monocítica THP-1 (células com expressão nula para o gene *TP53*; *TP53* $^{-/-}$). E para a produção das partículas lentivirais foram utilizadas as células empacotadoras virais HEK 293T. As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina / estreptomicina (chamado a partir de agora de meio completo) e utilizadas até a passagem 30. Enquanto as células HEK 293T foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina / estreptomicina. Durante todos os experimentos as células foram alocadas em estufas a 37 °C e 5% CO_2.

4.4 Produção lentiviral

Para a produção dos lentivírus pMEG, pMEG p53-Arg 72 e pMEG p53-Pro 72 foi realizada a transfecção do vetor de expressão vazio ou contendo uma das variantes do cDNA do gene *TP53* Arg72 ou *TP53* Pro72 (10 µg / garrafa), em conjunto com os plasmídeos contendo os elementos constitutivos virais pCMVΔR8.74 expressando os genes do vírus da imunodeficiência humana (HIV) gag / pol, Rev e tat (5 µg / garrafa) e o vetor pMD2G expressando o gene do envelope VSV-G (2 µg / garrafa) em células empacotadoras virais HEK 293T.

As células foram cultivadas em garrafas de polietileno de 25cm^2 com tampa com filtro (Corning Costar) e ao atingirem uma confluência de aproximadamente 60% os plasmídeos foram transfectados nas células utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, o meio das células foi retirado e substituído por 3 ml do meio reduzido Opti-MEN contendo os plasmídeos. Em seguida, as células foram incubadas durante 4 horas. Após esse período, foi adicionado mais 6 ml de meio Opti-MEN, completando um volume final de 10 ml. Após isso, as células foram incubadas over-nigth e em seguida o meio foi substituído por meio completo. Após 48 horas, as partículas lentivírais do sobrenadante foram recolhidas e filtradas em filtros de 0,22-µm e armazenadas a -80^0 C.

4.5 infecção lentiviral e seleção

As células da linhagem celular THP-1 *TP53* foram utilizadas como alvo dos vetores lentivirais produzidos. Para isso, 5 X 10^5 células foram distribuídas em tubos falcon de 15 ml, em cada falcon foi adicionado as células, meio completo, 8 ug de polibreno e um dos 3 lentivírus produzidos (pMEG, pMEG-Arg72 e pMEG-Pro 72) tendo um volume final de 2ml. O polibreno foi utilizado para aumentar a taxa de infecção lentiviral, pois atua neutralizando as cargas repulsivas entre a

superfície dos lentivírus e das células. Em seguida, foi realizada a spinoculação a 300g durante 2 horas a 32^0 C. Após isso, as células foram mantidas na estufa a 37^0 C over-nigth. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por meio completo. Após 72 horas, as células passaram a ser tratadas com puromínina (0,5 µM) por duas semanas para garantir a sobrevivência apenas das células devidamente infectadas pelos lentivírus.

O vetor lentiviral pMEG possui o gene da proteína verde fluorescente (GFP) que é utilizado como gene repórter. Após o tratamento com puromicina, as células foram analisadas quanto a porcentagem de células positivas para GFP em Citômetro de Fluxo e Sorting - FACSARIA III disponível no NPT-CPqAM/FIOCRUZ. Os resultados na citometria foram analisados através do software Flow Jo X. Além disso, as células foram observadas em microscópio de imunoflorescência para se avaliar a expressão da GFP.

4.6 Confirmação da inserção do inserto por PCR

Para confirmar a presença do cDNA do gene *TP53* nas células infectadas foi realizada uma PCR com o DNA genômico das células infectadas com os 3 diferentes lentivírus. Primeiro, o DNA genômico das células THP-1 foi extraído utilizando o Kit AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Minuprep Kit (Axygen) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, esse material foi utilizado para se realizar uma reação de PCR com o PCR Master Mix (Promega) e os primers *TP53* Foward e Reserve descritos na sessão 4.2, formando um produto de PCR de tamanho esperado de 542pb correspondente a uma parte especifica do gene. A reação ocorreu a um volume final de 20 µl. As temperaturas e tempos de ciclagem foram os seguintes: 1 ciclo de 5 min a 95^0 C, 35 ciclos de 1 minuto a 95^0 C, 1 minuto a 60^0 C, 1 minuto a 72^0 C, seguido por 1 ciclo de 72^0 C

de 5 min. Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% com o produto da PCR.

4.7 Ensaios in vitro

4.7.1 Analise da proliferação celular

Para analisar a taxa de proliferação celular dos diferentes grupo foi realizada a contagem das células em associação com o ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Para a contagem, um total de $5x10^4$ células de cada grupo foram distribuídas em triplicata, em 2 placas de 6 poços para cultura de células (Corning Costar) contendo um volume final de 5 ml de meio completo. Durante 10 dias, o conteúdo de cada placa foi homogeneizado e 50 µl da suspensão celular foi retirado e contado em câmara de Neubauer. As amostras foram identificadas de forma numérica por um investigador à parte do estudo e as contagens foram realizadas de maneira “cega” por três investigadores distintos.

As taxas de aumento da proliferação celular também foram avaliadas através do ensaio de MTT. Este ensaio se baseia na redução do MTT na mitocôndria pelas enzimas oxidorredutases NADH e NADPH. A reação converte os sais amarelos de MTT em cristais de formazan de coloração roxa. Dessa forma, o número de células e a viabilidade pode ser mensurada de forma indireta, através da análise de absorbância dos cristais solubilizados em solventes orgânicos em um espectrofotômetro (Supino, 1995). Para realizar a análise de proliferação por meio do ensaio de MTT, 50 µl da suspensão celular foram retirados de cada triplicada nos dias 0, 4, 6, 8 e 10 do experimento. As células foram distribuídas em placas de 96 poços, onde foi adicionado 100ul / poço da solução de MTT a uma concentração de 0,5mg / ml. Em seguida, a placa foi

incubada durante 3 horas a 37 °C e 5% CO_2. Após esse período, as placas foram centrifugadas a 300 g durante 5 min e, em seguida, o sobrenadante foi removido e substituído por 100 µl / poço de DMSO para solubilização os cristais de formazan. A leitura das placas foi realizada a uma absorbância de 570 nm em um leitor de microplacas de absorvância (xMark).

4.7.2 Ensaio de MTT com quimioterápicos

O ensaio de MTT também foi empregado para avaliar a sensibilidade das células aos quimioterápicos Ara-C e ATO. Para isso, foram cultivadas $2x10^4$ células / poço em triplicata em 100 µl de meio completo em placa de 96 poços. Neste ensaio foram utilizados os quimioterápicos Ara-C e trióxido de arsênio (ATO). Para analisar a sensibilidade das células a Ara-C, o quimioterápico foi adicionado ao meio nas seguintes concentrações: 0 (controle da reação), 100, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 nM. No ensaio utilizando ATO, o NaOH foi utilizado como veiculo do quimioterápico, que foi adicionado ao meio nas concentrações de: apenas NaOH (controle da reação), 1,5, 3, 5, 7 e 10 mM. As células foram incubadas durante 72 horas a 37 °C e 5% CO_2. Após esse período, o ensaio de MTT foi realizada como descrito no item 4.7.1.

4.8 Análise estatística

A análise da contagem de células e das taxas de absorbância realizadas durante o ensaio de proliferação foram avaliadas pelo teste one way ANOVA em conjunto com a análise de Tukey. Enquanto os resultados de ensaio de MTT com quimioterápicos foram analisados através de regressão não linear, a partir do qual também foi determinada a IC50. Neste ensaio, os dados foram normalizados a partir da condição controle. Todos os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 9.0.0 e os valores considerados significativos quando

P foi igual ou menor que 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Subclonagem

Para se produzir os vetores lentivirais, o gene *TP53* com as variantes Arg e Pro72 foi subclonado no vetor de expressão pMEG. Para isso, o gene *TP53* foi retirado do plasmídeo GFP-p53 através de digestão enzimática (Figura 5 A) e subclonado a jusante do promotor do vírus de células tronco murinas (MSCV) para garantir sua expressão constitutiva na linhagem mieloide THP-1. Além disso, a digestão do pMEG após a subclonagem também foi realizada para confirmar a presença do inserto no vetor de expressão, onde foi possível observar uma banda de tamanho esperado para o gene *TP53* no gel de agarose (Figura 5 B).

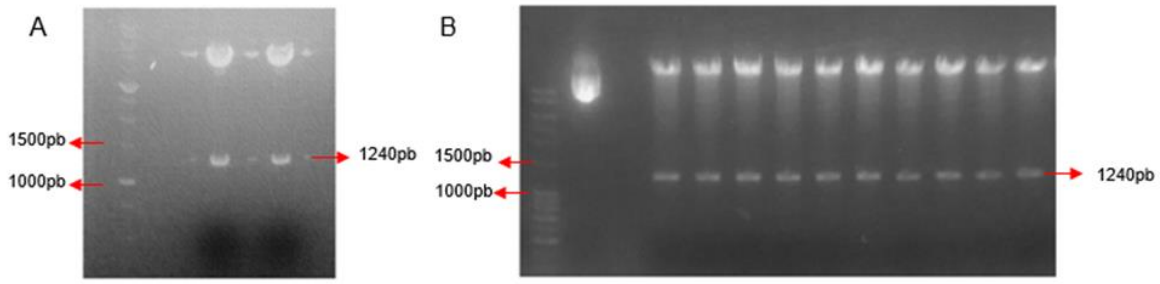

Figura 5: Digestão enzimática dos plasmídeos com as enzimas NheI e Bam HI onde é possível observar a banda de 1240 pb esperada para o gene p53. O marcador de 1 Kb pode ser observado na primeira coluna do lado esquerdo de ambas as imagens com setas vermelhas indicando as bandas de 1500 e 1000 pb. A **–** Digestão enzimática dos plasmídeos GFP-p53 para se retirar o cDNA do gene *TP53* e posteriormente purificá-lo. Na parte superior da imagem é possível observar o vetor GFP-p53 linearizado e a banda de tamanho correspondente a p53 abaixo indicada pela seta vemelha **B –** Digestão do plasmídeo pMEG após a ligação com o inserto contendo o cDNA do gene *TP53* para confirmar a subclonagem. É observado o vetor pMEG linearizado e a banda de tamanho correspondente a p53 a baixo indicada pela seta vermelha.

5.2 Sequenciamento

Os plasmídeos pMEG-Arg72 e pMEG-Pro72 foram sequenciados para confirma a presença dos códons determinantes dos aminoácidos arginina e prolina no códon 72 do cDNA do gene *TP53* presente nos plasmídeos. Na figura 7 é possível observar o códon determinante para o aminoácido arginina presente no plasmídeo pMEG-Arg72 e prolina no plasmídeo pMEG-Pro72.

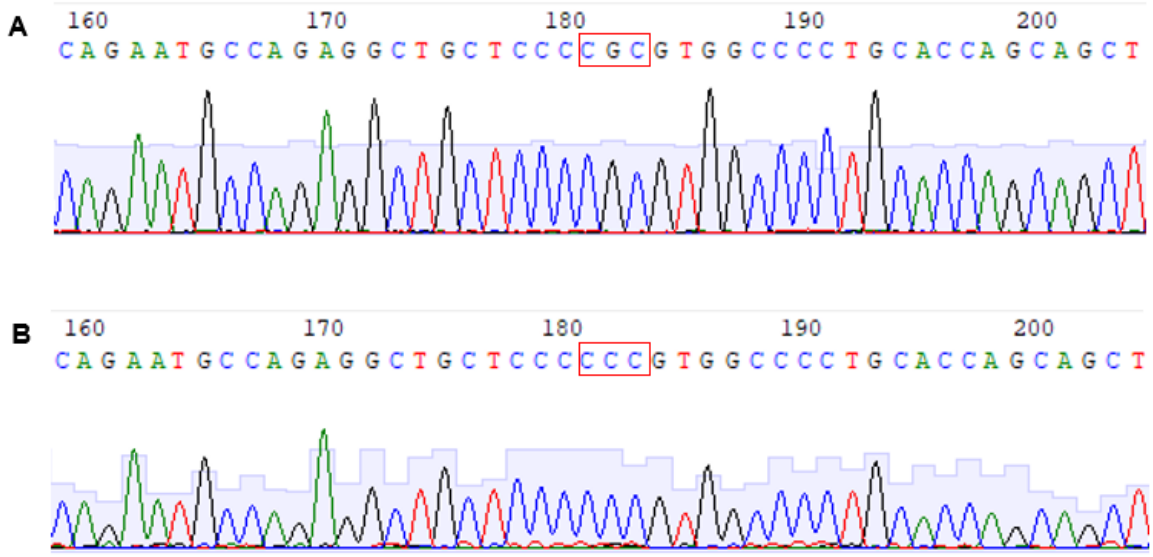

Figura 6: Eletroferograma do sequenciamento dos plasmídeos contendo o gene TP53. A **–** É observado o códon que determina o aminoácido arginina destacado. **B -** É observado o códon que determina o aminoácido prolina destacado.

5.3 Infecção das células-alvo

Para obter as células da linhagem THP-1 expressando a p53, as mesmas foram submetidas a infecção com vetores lentivirais contendo as variantes Arg72, Pro72 ou vetor vazio, através da adição dos vírus mais polibreno as células, seguido por spinoculação. Em seguida, as células foram tratadas durante duas semanas com puromicina. O Vetor de expressão pMEG possui um gene que confere resistência a puromicina. Dessa forma, apenas as células infectadas com os lentivírus resistem a presença desse antibiótico no meio cultura. Após o

tratamento, as células foram observadas em microscópio de imunofluorescência para se analisar a expressão da GFP (Figura 7).

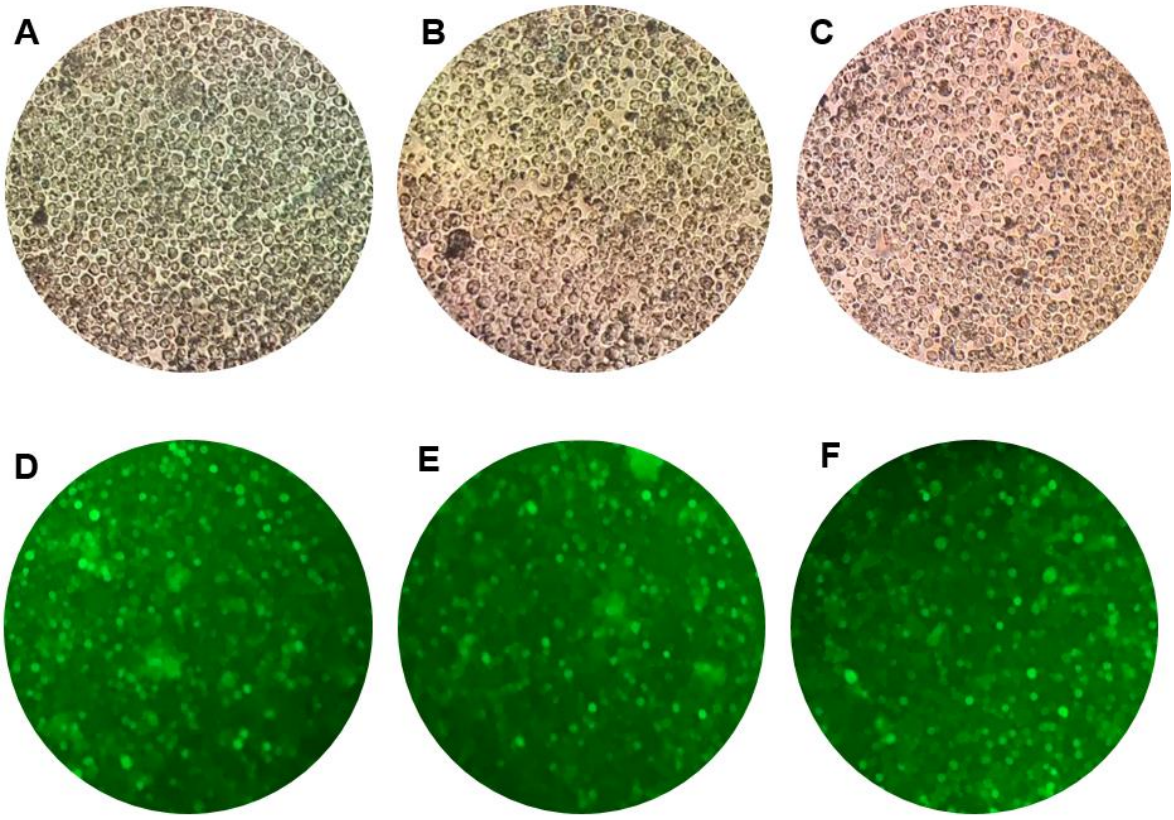

Figura 7: Células observadas através de microscopia óptica e de imunofluorescência**.** Nas imagens A, B e C são observadas através de microscopia óptica as células dos grupos pMEG, pMEG–Arg 72 e pMEG–Pro72, respectivamente. Nas imagens D, E e F são observadas através de microscopia de imunofluorescência as células dos grupos pMEG, pMEG–Arg 72 e pMEG–Pro72, respectivamente.

Além disso, as células foram analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão da GFP. Foi observada uma taxa de células GFP positivas de 98,8%, 83,3% e 98,3% para as células infectadas com os vetores lentivirais pMEG, pMEG–Arg 72 e pMEG–Pro72, respectivamente (Figura 8).

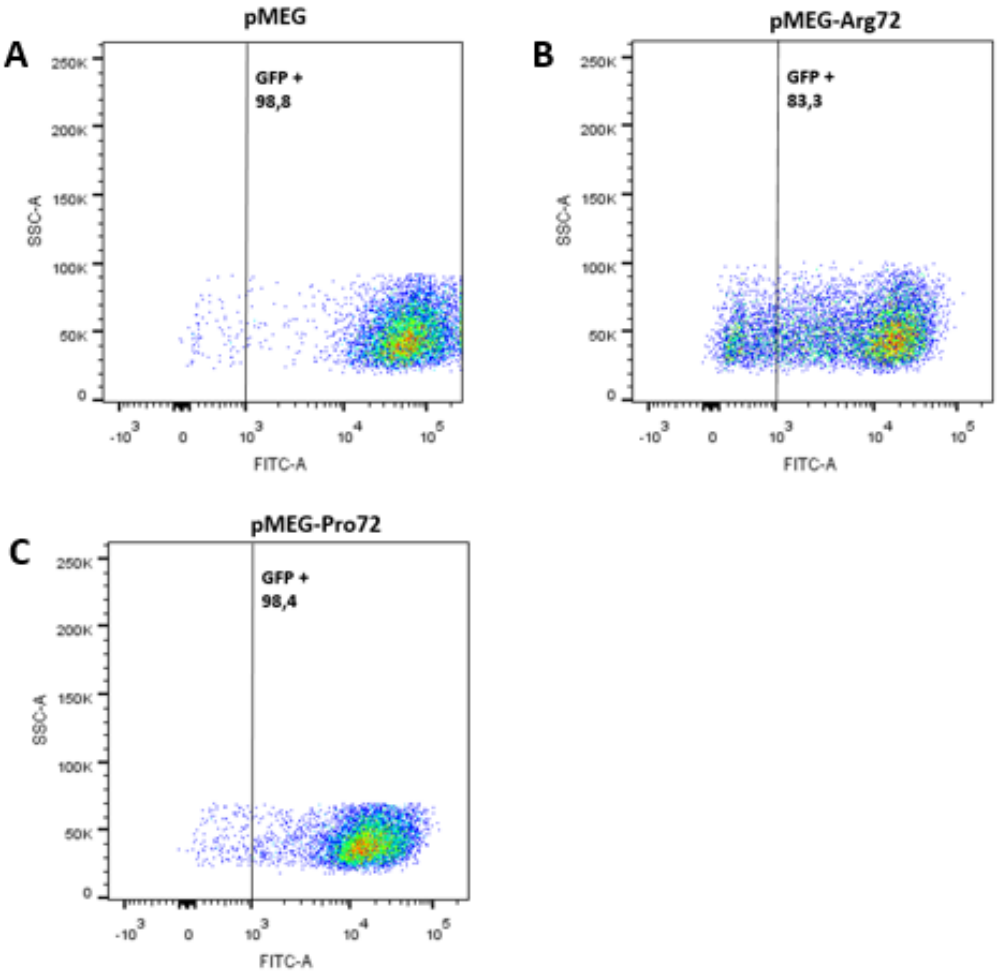

Figura 8: Analise realizada em citometro de fluxo quanto a expressão da GFP nas células infectadas com os plasmídeos pMEG, pMEG-Arg e pMEG-Pro. A – células infectadas com os vetores lentivirais que continham o plasmídeo pMEG, onde é observado uma taxa de células GFP positivas de 98,8%. **B –** Células infectadas com o vetor lentivíral pMEG-Arg72, com 83,3% de células GFP positivas. **C –** Células infectadas com os vetores lentiviral pMEG-Pro72, com 98,4% de células GFP positivas.

5.4 Confirmação do inserto no genoma das células

Foi realizada uma reação de PCR com o DNA genômico das células para se confirmar a presença do cDNA do gene *TP53* nos três grupos de células (pMEG, pMEG-Arg72 e pMEG-Pro72). Foi feita uma corrida em gel de eletroforese a 1% com o produto da PCR, onde foi observada uma banda de

tamanho esperado para os primers utilizados de 542 pb nos grupos pMEG-Arg72 e pMEG-Pro72 e ausência de qualquer banda no grupo pMEG (Figura 9).

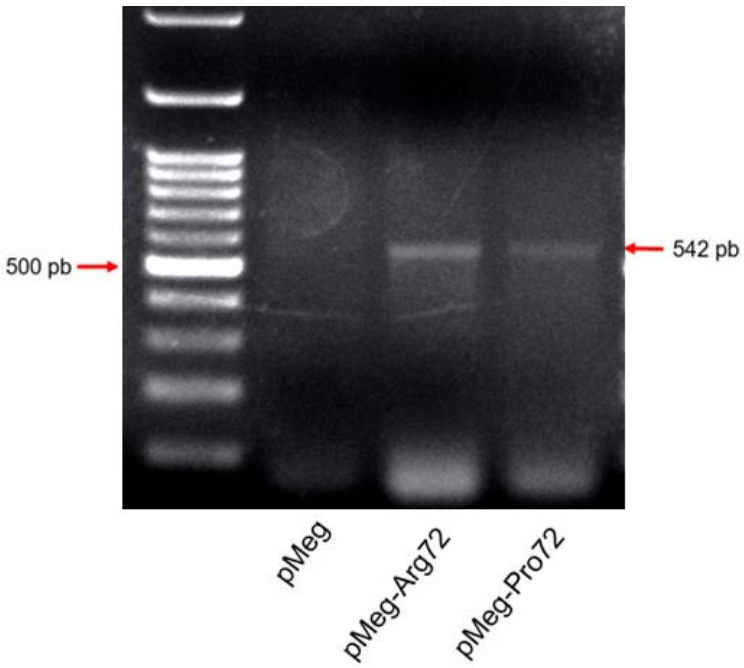

Figura 9: Eletroforese com o produto da PCR utilizando primers para o cDNA da p53. É observado bandas produzidas do tamanho esperado do produto da PCR de 542pb (indicada pela seta vermelha a direita). É observado o marcador de 500 pb do lado esquerdo da imagem, com a banda de 500 pb indicada por uma seta vermelha.

5.5 Ensaio de proliferação celular

Para se analisar o impacto do polimorfismo Arg72Pro nas taxas de crescimento celular foi realizado o ensaio de proliferação celular. Até o segundo dia de experimento não foi observada diferença estatística entre os grupos. No entanto, no terceiro dia o grupo pMEG diferiu dos grupos pMEG-Arg72 e pMEG-Pro72, com uma maior taxa proliferativa. Essa diferença permaneceu a mesma durante todo o experimento. Sendo observado no décimo dia o número total de

células para o grupo pMEG de 1,252 x 10^6 de 0,95 X 10^6 para o grupo pMEG-Arg72 e de 0,8 x 10^6 para o grupo pMEG-Pro72. Dessa forma, não foi observado impacto do polimorfismo Arg72Pro nas taxas de proliferação celular entre os grupos.

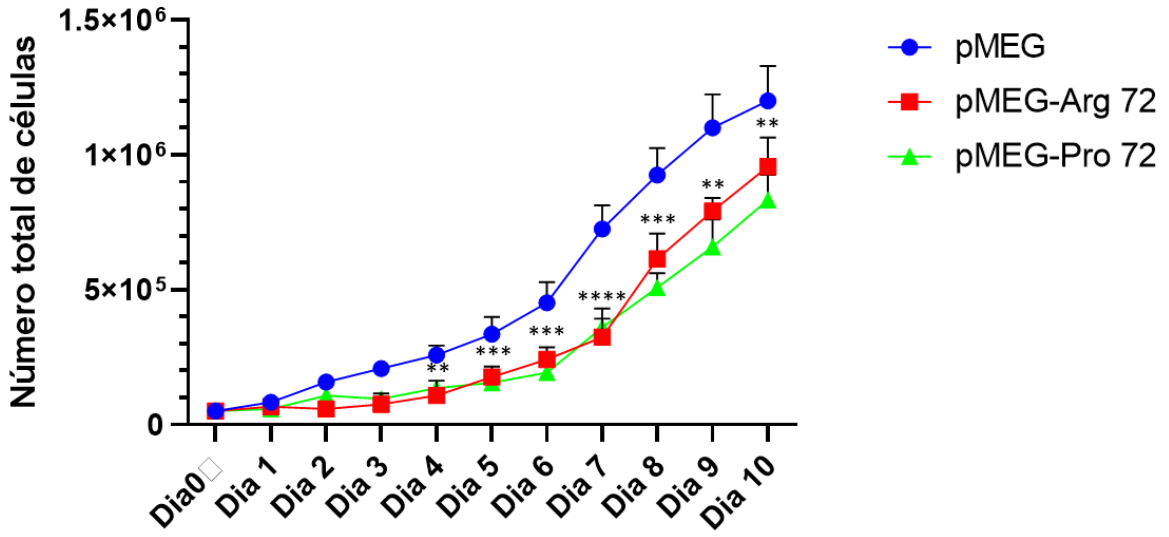

Figura 10: Taxas de crescimento celular ao longo de dez dias dos grupos pMEG, Arg72 e Pro72. Os grupos pMEG-ARG e pMEG-PRO72 apresentam diferença significativa em relação ao grupo pMEG a partir do dia 4. Esta diferença permaneceu a mesma nos demais dias de experimento. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

Em associação com a contagem das células foi realizado o ensaio de MTT. Este ensaio mensura de forma indireta a quantidade de células viáveis a partir da presença de cristais de formazan no meio, que foram produzidos a partir da conversão do MTT nestes cristais por enzimas mitocondriais. Utilizando este ensaio, nos dias 4, 6, 8 e 10 do experimento de proliferação celular foi retirado um volume de 50 µl de cada triplicada para analisar a taxa metabólica de cada grupo. Com isso, os grupos não diferiram entre sí na análise realizada no dia 4. No entanto, nos dias 6, 8 e 10 o grupo pMEG apresentou maior taxa metabólica que os demais grupos. Não foi observada diferença estatística nas taxas de

absorbância entre os grupos pMEG-Arg72 e pMEG-Pro72 durante todo o experimento (Figura 11).

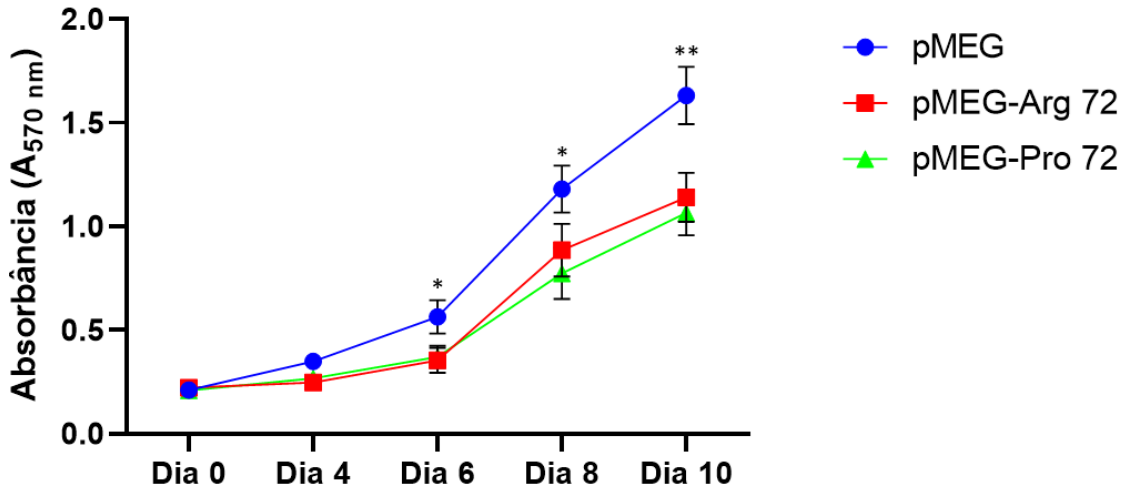

Figura 11: Taxas de absorbância dos diferentes grupos observadas após o ensaio de MTT. O grupo pMEG apresenta maior taxa proliferativa que os demais grupos a partir a partir do dia 6. Está diferença também é observada nos dias 8 e 10. *P < 0.05; **P < 0.01.

5.6 Ensaio de MTT com quimioterápicos

Para a analisar a sensibilidade das variantes Arg e Pro72 aos quimioterápicos Ara-C e ATO foi realizado o ensaio de MTT. No ensaio realizado com o Ara-C, o quimioterápico foi adicionado em diferentes concentrações (100, 250, 500, 1000, 1500 e 2000nM) nas células como estímulo apoptótico. Até a concentração de 250 nM não foi observada diferença estatística na diminuição da viabilidade entre os grupos. A partir da concentração de 500 nM o grupo pMEG-Arg72 diferiu dos demais, sendo a viabilidade deste grupo para o tratamento com esta concentração de 48,31% ± 4,35, e o dos grupos pMEG e pMEG-Pro72 de 65,50% ± 4,87 e 63,33 ± 3,68, respectivamente. Para as demais concentrações (1000, 1500 e 2000 nM) as células do grupo pMEG-Arg72 apresentaram menor

viabilidade significativamente quando comparado aos outros dois grupos (pMEG-Pro72 e pMEG) que não tiveram diferença estatística entre si (Figura 12).

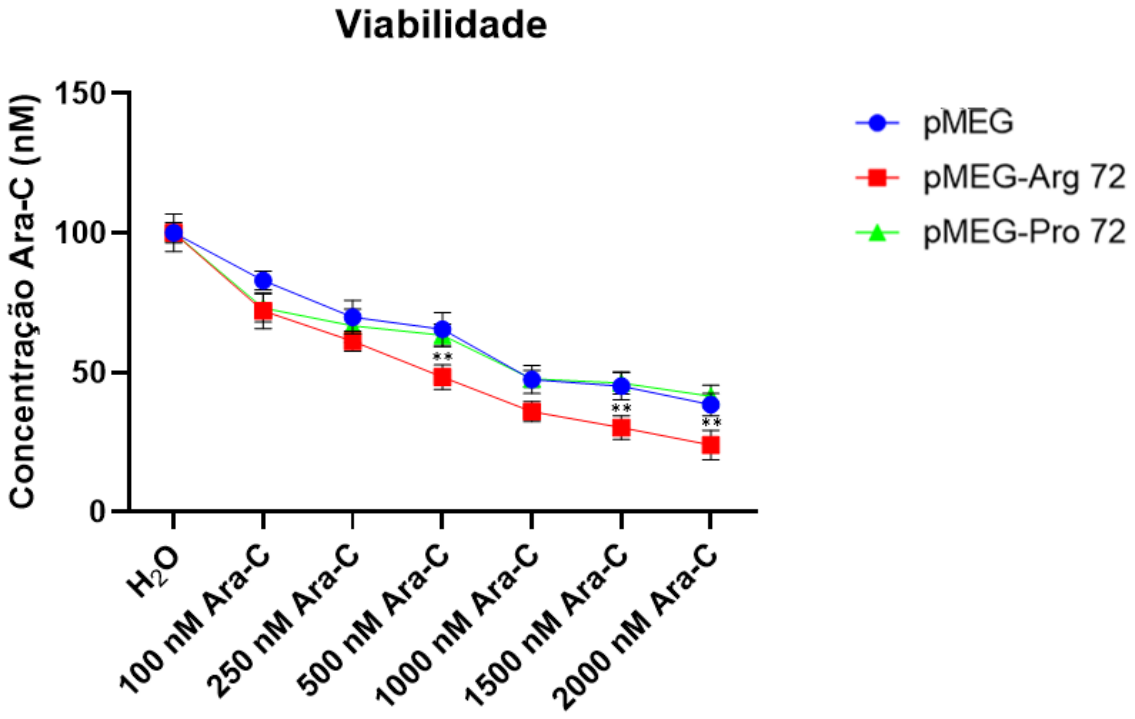

Figura 12: Taxas de viabilidade celular dos grupos tratados diferentes concentrações de Ara-C. É observada maior sensibilidade do grupo de células que continham a proteína p53 com a variante arginina no códon 72. Com as células apresentando maior sensibilidade que os grupos pMEG e pMEG-Pro 72 a partir da concentração de 500nm. *P < 0.05; **P < 0.01.

A IC_{50} para o grupo pMEG-Arg72 foi obtida na concentração de 409,57 ± 47,47 nM de Ara-C, diferindo significativamente da concentração necessária para atingir a IC_{50} no grupo pMEG-Pro72, que foi alcançada apenas na concentração de 1054,57 ± 138,63 e que não diferiu significativamente do grupo pMEG 1058,76 ± 112,13 (Figura 13). Tais resultados demonstram uma maior sensibilidade da variante polimórfica Arg72 a um dos principais quimioterápicos utilizados na prática clínica no tratamento de pacientes com LMA.

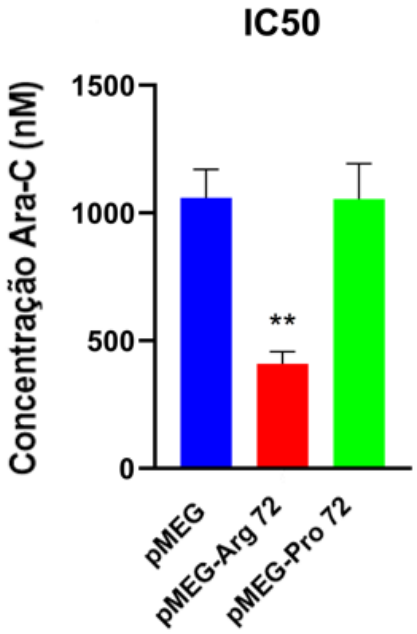

Figura 13: IC_{50} dos grupos pMeg, pMeg Arg72 e pMeg Pro72. A IC_{50} das células que expressavam a proteína p53 com a variante arginina no códon 72 diferiu dos demais grupos, sendo alcançada na concentração de 409,57nm, enquanto que para os grupos pMEG e pMEG-Pro 72 a IC_{50} foi obtida apenas a partir da concentração de 1058,76 e 1054,57, respectivamente. ** $P < 0.01$.

No ensaio realizado com ATO, foi observado que a concentração de 1 µM de ATO causou uma leve redução na viabilidade celular, sendo observada a viabilidade para os grupos pMEG, pMEG-Arg72 e pMEG-Pro72 de 94,61 % ± 5,10, 84,65 ± 3,65 e 86,46, ± 4,29, respectivamente. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Também não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações de 1,5 e 3 µM. No entanto, na concentração de 5 µM os grupos pMEG-Arg72 (43,94 ± 9,25) e pMEG-Pro72 (47,02 ± 5,1) apresentaram menor viabilidade significativa que o grupo pMEG (67,13 ± 5,45), porém não diferiram entre si. A diferença permaneceu a mesma na concentração de 5 µM. E na concentração de 10 µM não houve diferença estatística entre nenhum grupo, o grupo pMEG apresentou viabilidade de 47,5 % ± 6,11, o grupo pMEG-Arg72 36,56% ± 7,25 e o grupo pMEG-Pro 41,1% ± 7,91 (Figura 14). Dessa forma, não foi observada diferenças na sensibilidade ao ATO

pelas variantes Arg e Pro 72.

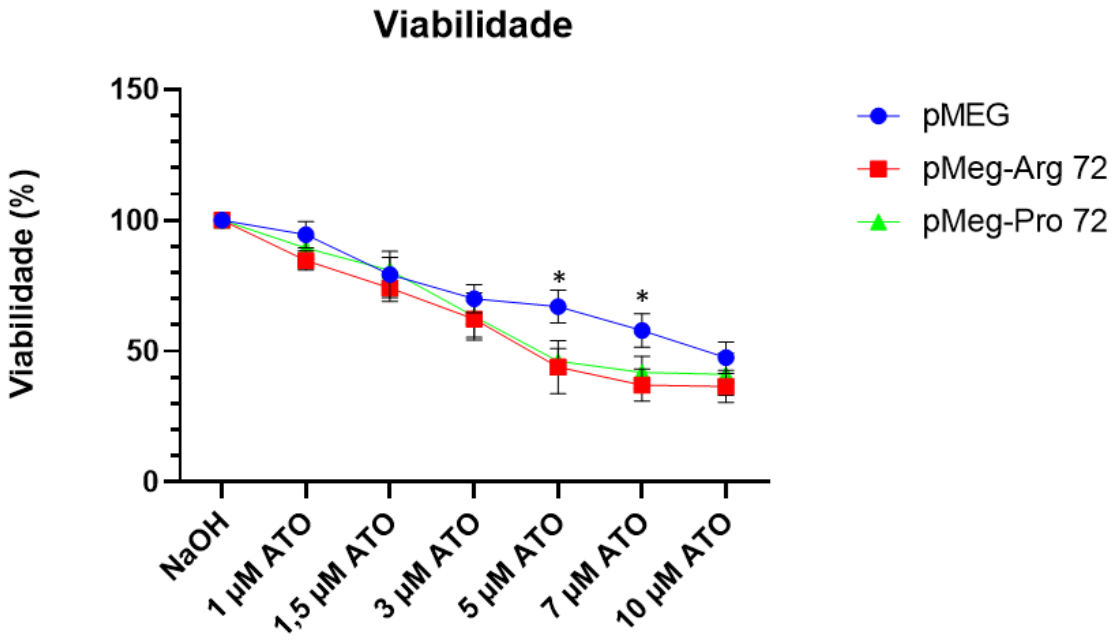

Figura 14: Taxas de viabilidade celular dos grupos tratados diferentes concentrações de ATO. Não é observada diferença nas taxas de inibição em todos os grupos até a concentração de 3 µM de ATO. No entanto, nas concentrações de 5 e 7 µM o grupo pMEG diferiu dos demais com uma maior viabilidade. Na concentração de 10 µM não houve diferença na viabilidade entre nenhum dos grupos. *P < 0.05

Ao analisar a IC_{50} para o quimioterápico ATO foi observado que o grupo pMeg-Arg72 teve a viabilidade diminuída em 50% a partir da concentração de 4,12 ± 0,7, enquanto o grupo pMEG-Pro 72 teve sua viabilidade reduzida com 4,6 ± 0,5 µM de ATO. No entanto, não foi observada diferença estatística na IC_{50} para esses dois grupos. Para o grupo controle pMEG a IC_{50} alcançada na concentração de 9,3 ± 0,8 µM (Figura 15).

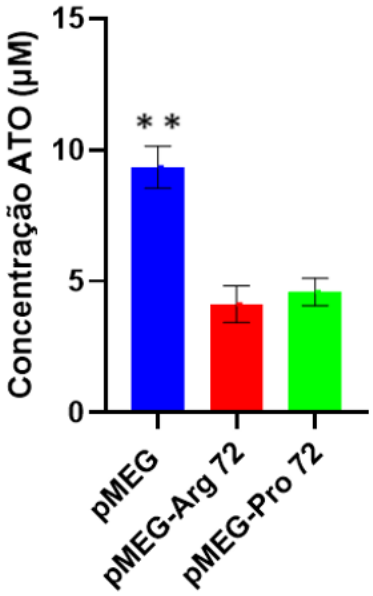

Figura 15: IC_{50} dos grupos pMEG, pMEG-Arg72 e pMEG-Pro72 para o quimioterápico ATO**.** É observado que os grupos pMEG-Arg72 e pMEG-Pro72 foram mais sensíveis a presença no quimioterápico ATO no meio, com a IC_{50} destes grupos sendo alcançada nas concentrações de 4,12 e 4,6 µM, respectivamente. Enquanto que a IC_{50} para o grupo pMEG foi obtida apenas na concentração de 9,3 µM. *P <0.05.

6. DISCUSSÃO

Para avaliar o papel do polimorfismo Arg72Pro na LMA, foram produzidas células da linhagem monocitica THP-1 expressando de forma constitutiva as variantes Arg ou Pro 72 da proteína 53. Os resultados obtidos demonstraram que polimorfismo Arg72Pro pode ou não modular a atividade da p53 dependendo da função que está sendo exercida pela proteína.

Como foi observado no ensaio de proliferação, tanto na contagem das células, bem como no ensaio de MTT, não houve diferença nas taxas proliferativas entre as células dos grupos que expressavam as variantes Arg e Pro72. Estes resultados diferem dos encontrados por Zhao e colaboradores (2018) que avaliaram as taxas proliferativas de células epiteliais de camundongos e observaram que os animais homozigotos para a variante Arg72 tiveram menores taxas de crescimento celular. Também foi demonstrado que, em células de linhagem celular de sarcoma Saos-2, a variante Pro 72 induziu a parada do crescimento celular de forma mais intensa que a variante Arg72, especialmente na fase G1 do ciclo celular (Pim & Banks, 2004). Com isso, é possível que a forma como os polimorfismos presentes do códon 72 da proteína p53 afetem a sua atividade biológica de forma contexto dependendo, com o impacto dos alelos variando de acordo com o tipo celular, estágio da doença e tratamento adotado (Bezerra *et al*., 2017). No entanto, são necessários mais estudos para confirmar o papel do polimorfismo Arg72Pro nas taxas de crescimento celular na LMA.

O ensaio de MTT também foi utilizado para avaliar a sensibilidade das células aos quimioterápicos Ara-C e ATO. Embora não tenha sido observada diferença na sensibilidade dos grupos Arg e Pro72 para o quimioterápico ATO, as células expressando p53-Arg72 tiveram uma maior sensibilidade para Ara-C, com

uma IC_{50} de 409,57 ± 47,47 nM, e o grupo Pro72 com uma IC_{50} de 1054,57 ± 138,63 nM. O que sugere que este polimorfismo pode influenciar no tratamento da LMA. No entanto, Bezerra e colaboradores (2017) relataram que, embora pacientes com o genótipo *TP53* Pro/Pro estivessem associados a um maior risco leucemogênico, apresentaram resultados favoráveis, especialmente para os indivíduos classificados para o grupo de risco citogenético intermediário.

Embora não tenha sido observada diferença nas células tratadas com ATO, a maior sensibilidade das células expressando a variante Arg 72 corrobora com os achados de diferentes trabalhos que indicam este alelo como mais eficiente na indução da atividade apoptótica. Dumont e colaboradores (2003) observaram que a variante Arg72 induzia a apoptose até cinco vezes mais do que a variante Pro72. Os autores associaram essa diferença na indução de apoptose devido a maior concentração da p53-Arg72 na mitocôndria que induz apoptose através da liberação do citocromo c no citoplasma. Além disso, Boyd e colaboradores (2000) relatam que a maior capacidade de indução apoptótica da p53-Arg72 ocorre devido a uma maior interação dessa variante com a proteína MDM2, promovendo a exportação celular. Embora a variante Arg 72 seja mais eficiente na indução da apoptose, é hipotetizado que está variante aumente a predisposição ao desenvolvimento neoplásico por ser menos eficiente na ativação dos genes de reparo de DNA (Siddique & Sabapathy, 2006).

O Ara-C inibe a duplicação da molécula de DNA durante a fase S do ciclo celular ao ser incorporada a fita que está sendo produzida, atuando como um análogo de desoxicitidina (Momparler, 2013). Enquanto o ATO promove a fragmentação do DNA e a degradação de diferentes enzimas intracelulares. Jeong e colaboradores (2010) demonstraram que subconjuntos de genes

aumentam ou diminuem sua expressão dependo de qual alelo variante, Arg ou Pro 72, esteja sendo expresso na célula (Davison *et al*., 2010). Dessa forma, utilizando diferentes linhagens isogênicas humanas, os autores observaram que células expressando a variante Arg 72 tiveram maior expressão dos genes *PERP, DR-4, NOXA, PUMA* e *PIG-3.l*, que são genes apoptóticos. Por isso, é possível que os resultados observados para os diferentes quimioterápicos sejam devido aos diferentes mecanismos de ação e expressão de subconjuntos de genes específicos, frente aos diferentes mecanismos de ação dos fármacos ATO e Ara-C.

Apesar de mutações no gene TP53 serem as principais causas de inativação e alteração da atividade da proteína, e serem fortemente associadas como um fator de risco oncogênico, é sugerido que polimorfismos, incluindo o Arg72Pro, aumentem o risco de desenvolvimento neoplásico. Dessa forma, é possível que o polimorfismo *TP53* Arg72Pro module a atividade da proteína p53 na LMA, podendo servir como um possível alvo terapêutico na doença. No entanto, são necessários mais ensaios para melhor caracterizar o papel deste polimorfismo na LMA.

7 CONCLUSÕES

Através das análises realizadas foi avaliado o papel modulador nas respostas celulares das quais a p53 participa nos grupos de células contendo as variantes Arg e Pro72. Não foi observada diferença nas taxas de proliferação celular das células leucêmicas THP-1 que expressavam a variante Arg ou Pro72 da proteína p53. No entanto, a variante Arg72 demonstrou maior sensibilidade ao quimioterápico Ara-C, um dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento da LMA. Dessa forma, é possível que o polimorfismo *TP53* Arg72Pro module a atividade da proteína p53 na LMA.

REFERÊNCIAS

Abegglen, L.M; Caulin, A.F; Chan, A; Lee, K; Robinson, R, Campbell, M.S; Kiso, W.K; Schmitt, D.L; Waddell, P.J; Bhaskara, S; *et al*. Potential mechanisms for cancer resistance in elephants and comparative cellular response to DNA damage in humans. **Jama**, v. 314, n. 17, p. 1850-1860, 2015.

Acharya, U.H; Halpern, A.B;, Wu, Q; Voutsinas, J.M; Walter, R.B; Yun, S; Kanaan, M; Estey, E.H. Impact of region of diagnosis, ethnicity, age, and gender on survival in acute myeloid leukemia (AML). **Journal of drug assessment**, v. 7, n. 1, p. 51-53, 2018.

Al-issa, K; Nazha, A. Molecular landscape in acute myeloid leukemia: where do we stand in 2016. **Cancer biology & medicine**, v. 13, n. 4, p. 474, 2016.

Allton, K; Jain, A.K; Herz, H.M; Tsai, W.W; Sung, Y.J; Qin, J; Bergmann, A; Johnson, R.L; Barton, M.C. *Trim24* targets endogenous p53 for degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 28, p. 11612-11616, 2009.

Arber, D.A; Orazi, A; Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, Cazzola M and Vardiman JW The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.

Avery-Kiejda, K.A; Morten, B; Wong-Brown, M.W; Mathe, A; Scott, R.J. The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 3, p. 586-596, 2014.

Bezerra, M.F; Silva, J.L.C; Nascimento, J.C; Benicio, M.T; Rocha, C.R; Machado, C.G; Rego, E.M; Bezerra, M.A; Araujo, A.R.L; Beltrão, E.I. Association between the TP53 Arg72Pro polymorphism and clinical outcomes in acute myeloid leukemia. **haematologica**, v. 102, n. 2, p. e43, 2017..

Bischof, K; Knappskog, S; Hjelle, S.M; Stefansson, I; Woie, K; Salvesen, H.B; Gjertsen, B.T; Bjorge, L. Influence of p53 isoform expression on survival in high-grade serous ovarian cancers. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019

Bischof, K; Knappskog, S; Stefansson, I; McCormack, E.M; Trovik, J; Werner H.M.J; Woie, K; Gjertsen, B.T; Bjorge, L. High expression of the p53 isoform γ is associated with reduced progression-free survival in uterine serous carcinoma. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2018.

Brunner, A.M; Blonquist. T,M; Sadrzadeh, H; Perry, A.M; Attar, E.C; Amrein, P.C; Ballen, K.K; Chen, Y; Neuberg, D.S; Fathi, A.T. Population-based disparities in survival among patients with core-binding factor acute myeloid leukemia: a SEER database analysis. **Leukemia research**, v. 38, n. 7, p. 773-780, 2014.

Burnett, A.K. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress?. **Hematology 2010, the American Society of Hematology Education Program Book**, v. 2012, n. 1, p. 1-6, 2012.

Bykov, V.J.N; Eriksson, S.E; Bianchi, J; Wiman, K.G. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 2, p. 89-102, 2018.

Campos, L; Guyotat, D; Archimbaud, E; Devaux, Y; Treille, D; Larese, A; Maupas, J; Gentilhomme, O; Ehrsam, A; Fiere, D; Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. **British journal of haematology**, v. 72, n. 2, p. 161-166, 1989.

Cheson, B.D; Bennett, J.M; Kopecky, K.J; Büchner, T; Willman, C.L; Estey, E.H; Schiffer, C.A; Doehner, H; Tallman, M.S; Lister, T.A. *et al*. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. **Journal of clinical oncology**, v. 21, n. 24, p. 4642-4649, 2003.

De Lima, M.C; Silva, D.B; Freund, A.P.F; Dacoregio, J.S; Costa, T.E.J.B; Costa, I; Faraco, D; Silva, M.L. Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate☆. **Jornal de pediatria**, v. 92, p. 283-289, 2016.

Deschler, B; Lübbert, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 107, n. 9, p. 2099-2107, 2006.

Döhner, H; Estey, E; Grimwade, D; Amadori, S; Appelbaum, F.R; Büchner, T; Dombret, H; Ebert, B.L; Fenaux, P; Larson, R.A. *et al*. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 4, p. 424-447, 2017.

Döhner, H; Estey, E.H; Amadori, S; Appelbaum, F.R; Büchner, T; Burnett, A.K; Dombret, H; Fenaux, P; Grimwade, D; Larson, R.A. *et al*. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 115, n. 3, p. 453-474, 2010.

Döhner, H. M. D; Daniel, J; Weisdorf, M. D; Clara, D; Bloomfield, M. Acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136-1152, 2015.

Drokow, E.K; Chen, Y; Waqas, A. H. A; Oppong, T.B; Akpabla, G.S; Pei, Y; Kumah, M. A; Neku, E.A; Sun, K. The relationship between leukemia and TP53 gene codon Arg72Pro polymorphism: analysis in a multi-ethnic population. **Future Oncology**, v. 16, n. 14, p. 923-937, 2020

Dumont, P; Leu, J. I. J; Della, P. A. C; George, D. L. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 357-365, 2003.

Davison, K; Mann, K. K;, Miller, J. W. H. Arsenic trioxide: mechanisms of action. **Seminars in hematology**. WB Saunders, 2002. p. 3-7.

Ellis, N. A; Huo, D; Yildiz, O; Worrillow, L. J; Banerjee, M; Le Beau, M. M; Larson, R. A; Allan, J.M; Onel, K. MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 112, n. 3, p. 741-749, 2008.

Farber, S. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). **New England Journal of Medicine**, v. 238, n. 23, p. 787-793, 1948.

Felley-Bosco, E; Weston, A; Cawley, H. M; Bennett, W. P; Harris, C. C. Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. **American journal of human genetics**, v. 53, n. 3, p. 752, 1993.

Finlay, C. A; Hinds, P.W; Levine, A. J. p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**, v. 57, n. 7, p. 1083-1093, 1989.

Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes. **Oncogene**, v. 36, n. 28, p. 3943-3956, 2017.

Godley, L. A. Inherited predisposition to acute myeloid leukemia. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, 2014. p. 306-321.

Grimwade, D; Mrózek, K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 25, n. 6, p. 1135-1161, 2011.

Gu, R; Yang, X; Wei, H. Molecular landscape and targeted therapy of acute myeloid leukemia. **Biomarker research**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2018.

Gunaratna, R. T; Santos, A; Luo, L; Nagi, C; Lambertz, I; Spier, M; Conti, C. J; Fuchs-Young, R. S. Dynamic role of the codon 72 p53 single-nucleotide polymorphism in mammary tumorigenesis in a humanized mouse model. **Oncogene**, v. 38, n. 18, p. 3535-3550, 2019.

Döhner, H; Weisdorf, M. D; Clara, D; Bloomfield, M. Acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136-1152, 2015.

INCA (2017) Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil. Inst Nac Câncer José Alencar Gomes da Silva.

Ismail, I; Sulong, S; Al Jamal, H; Johan, M. F; Hassan, R. Differential expression profiles of miRNAs and correlation with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. **Meta Gene**, v. 16, p. 182-188, 2018.

Jiang, D. K; Ren, W. H; Yao, L; Wang, W. Z; Peng, B; Yu, L. Meta-analysis of association between TP53 Arg72Pro polymorphism and bladder cancer risk. **Urology**, v. 76, n. 3, p. 765. e1-765. e7, 2010.

Joerger, A. C; Fersht, A. R. The p53 pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches. **Annual review of biochemistry**, v. 85, p. 375-404, 2016.

Joruiz, S. M; Bourdon, J. C. p53 isoforms: key regulators of the cell fate decision. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 8, p. a026039, 2016.

Kastenhuber, E. R; Lowe, S. W. Putting p53 in context. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1062-1078, 2017.

Khwaja, A; Bjorkholm, M; Gale, R.E; Levine, R. L; Jordan, C. T; Ehninger, G; Bloomfield, C. D; Estey, E; Burnett, A; Cornelissen, J. J; *et al*. Acute myeloid leukaemia. **Nature reviews Disease primers**, v. 2, n. 1, p. 1-22, 2016

Kodal, J. B; Vedel-Krogh, S; Kobylecki, C. J; Nordestgaard, B. G; Bojesen, S.E. TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

Kouchkovsky I, Abdul-Hay, I. D. K. M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. **Blood cancer journal**, v. 6, n. 7, p. e441-e441, 2016.

Kumari, R; Kohli, S; Das, S. p53 regulation upon genotoxic stress: intricacies and complexities. **Molecular & cellular oncology**, v. 1, n. 3, p. e969653, 2014.

Kuykendall, A; Duployez, N; Boissel, N; Lancet, J. E. Leukemia M and Are ALL Acute myeloid leukemia: the good, the bad, and the ugly. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 38, p. 555-573, 2018.

Lamb, P; Crawford, L. Characterization of the human p53 gene. **Molecular and cellular biology**, v. 6, n. 5, p. 1379-1385, 1986.

Lane, D. P; Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. **Nature**, v. 278, n. 5701, p. 261-263, 1979.

Lima, J. M; Serafim, P. V. P; Silva, I. D. C. G; Forones, N. M Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 43, n. 1, p. 8-13, 2006.

Lind, H; Ekstrøm, P. O; Ryberg, D; Skaug, V; Andreassen, T; Stangeland, L; Haugen, A; Zienolddiny, S. Frequency of TP53 Mutations in Relation to Arg72Pro Genotypes in Non–Small Cell Lung Cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 16, n. 10, p. 2077-2081, 2007.

Lindsley, R. C; Mar, B. G; Mazzola, E; Grauman, P. V; Shareef, S; Allen, S. L; Pigneux, A; Wetzler, M; Stuart, R. K; Erba, H. P; *et al*. Acute myeloid leukemia

ontogeny is defined by distinct somatic mutations. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 125, n. 9, p. 1367-1376, 2015.

Meek, D. W; Anderson, C. W. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a000950, 2009. A tribute to Sidney Farber - The father of modern chemotherapy. Br J Haematol 134:20–26. British journal of haematology, 134(1), 20-26.

Othus, M; Kantarjian, H; Petersdorf, S; Ravandi, F; Godwin, J; Cortes, J; Pierce, S; Erba, H; Frederick, R. S. Appelbaum EE Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given 'intense'induction regimens: a report from SWOG and MD Anderson. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 289-292, 2014.

Qiao, Q; Hu, W. The association between TP53 Arg72Pro polymorphism and lung cancer susceptibility: evidence from 30,038 subjects. **Lung**, v. 191, n. 4, p. 369-377, 2013.

Roboz, G. J; Rosenblat, T; Arellano, M; Gobbi, M; Altman, J. K; Montesinos, P; O'Connell, C; Solomon, S. R; Pigneux, A; Vey, N; *et al*. International randomized phase III study of elacytarabine versus investigator choice in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. **Journal of clinical oncology**, v. 32, n. 18, p. 1919-1926, 2014.

Ruan, X. L; Li. S; Meng, X. Y; Geng, P; Gao, Q. P; Ao, X. B. The role of TP53 gene codon 72 polymorphism in leukemia: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 94, n. 38, 2015.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbord, Cold Spring Harbord Laboratory Press. **New York. EE. UU**, 1989. .

Shallis, R. M; Wang, R; Davido, A; Ma, X; Zeidan, A. M. Epidemiology of acute myeloid leukemia: recent progress and enduring challenges. **Blood reviews**, v. 36, p. 70-87, 2019.

Short, N. J; Rytting, M. E; Cortes, J. E. Acute myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 392, n. 10147, p. 593-606, 2018.

Siddique, M; Sabapathy, K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. **Oncogene**, v. 25, n. 25, p. 3489-3500, 2006.

Spector, L. G; Marcotte, E. L; Kehm, R; Poynter. Epidemiology and hereditary aspects of acute leukemia. In: **Neoplastic diseases of the blood**. Springer, New York, NY, 2013. p. 199-212.

SOUSSI, T; WIMAN, K. G. TP53: an oncogene in disguise. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 8, p. 1239-1249, 2015.

Storey, A; Thomas, M; Kalita, A; Harwood, C; Gardiol, D; Mantovani, F; Breuer, J; Leigh, I. M; Matlashewski, G; Banks, L. Role of a p53 polymorphism in the

development of human papilloma-virus-associated cancer. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 229-234, 1998.

O'hare, Sheila; Atterwill, Chris K. **In vitro toxicity testing protocols**. Totowa,(NJ): Humana Press, 1995.

Tapper, W; Jones, A. V; Kralovics, R; Harutyunyan, A. S; Zoi, K; Leung, W; Godfrey, A. L; Guglielmelli, P; Callaway, A; Ward, D. *et al*. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2015.

Thomas, D; Majeti, R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 12, p. 1577-1585, 2017.

Thomas, M; Kalita, A; Labrecque, S; Pim, D; Banks, L; Matlashewski, G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 2, p. 1092-1100, 1999.

Tian, X; Dai, S; Sun, J; Jiang, S; Jiang, Y. Association between TP53 Arg72Pro polymorphism and leukemia risk: a meta-analysis of 14 case-control studies. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2016.

Van Heemst, D; Mooijaart, S. P; Beekman, M; Schreuder, J; Craen, A. J; Brandt, B. W. Westendorp, R. G. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 1-2, p. 11-15, 2005.

Vericat, J. E; Montesinos, P;, Herrero, M. J; Moscardo, ;, Boso, V;, Rojas, L; Aliño, S. F. Impact of NADPH oxidase functional polymorphisms in acute myeloid leukemia induction chemotherapy. **The pharmacogenomics journal**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2018.

Wang, Y. C, Wei, L. J; Liu, J. T; Li, S. X. Wang, Q. S. Comparison of cancer incidence between China and the USA. **Cancer biology & medicine**, v. 9, n. 2, p. 128, 2012.

Webster, J. A; Pratz, K. W; Webster, J. A; Pratz, K. W; Webster, J. A; Pratz, K. W. Acute myeloid leukemia in the elderly: therapeutic options and choice. **Leukemia & lymphoma**, v. 59, n. 2, p. 274-287, 2018.

Wei, C. L; Wu, Q; Vega, V. B; Chiu, K. P. N. P; Zhang, T,;Shahab, A; Yong, H. C; Fu, Y. T; Weng, Z. *et al*. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 207-219, 2006.

Wolach, O; Stone, R. M. How I treat mixed-phenotype acute leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 125, n. 16, p. 2477-2485, 2015.

Zhang, H; Savage, S; Schultz, A. R; Bottomly, D; White, L; Segerdell, E; Wilmot, B; Mcweeney, S. K; Eide, C. A; Nechiporuk, T. *et al*. Clinical resistance to crenolanib in acute myeloid leukemia due to diverse molecular mechanisms. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2019.