



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

JOSÉ BRUNO ROBERTO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PARP1*, *PARP2* E *PARP3* EM
PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Recife
2022

JOSÉ BRUNO ROBERTO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PARP1*, *PARP2* E *PARP3* EM
PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Silva, José Bruno Roberto da

Avaliação da expressão dos genes *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* em pacientes adultos com leucemia mieloide aguda / José Bruno Roberto da Silva. – 2022.

82 f. : il.

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

Coorientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Leucemia mieloide aguda. 2. Citogenética. 3. Expressão gênica. I. Araújo, Antônio Roberto Lucena de (orientador). II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (coorientador). III. Título.

616.99419

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-133

JOSÉ BRUNO ROBERTO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PARP1*, *PARP2* E *PARP3* EM
PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em: 21/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Jaqueline de Azevedo Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Matheus Filgueira Bezerra (Examinador Externo)

RESUMO

O impacto de alterações na expressão de genes relacionados ao reparo de DNA, como os membros da família PARP (do inglês, *Poly(ADP-ribose) polymerases*), foram descritos como importantes preditores de prognóstico de pacientes em diversos tumores sólidos, embora pouco se saiba sobre seu impacto em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA). Objetivando avaliar a expressão dos genes *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* e seu impacto nos desfechos clínicos de paciente adultos com LMA, foram analisadas 3 coortes independentes: Recife: 81 pacientes (dados obtidos por RTq-PCR e metodologia Sybr Green) e TCGA: 173 pacientes e GSE6891: 245 (dados obtidos de banco de dados públicos). Na coorte de TCGA e GSE, a expressão de PARP1/2/3 foi maior em pacientes com cariótipo complexo ($p < 0,001$) e risco desfavorável ($p < 0,001$). Além disso, a expressão elevada foi associada a uma diminuição significativa da sobrevida global dos pacientes: PARP1 (TCGA: 24 meses vs 51 meses, $p = 0,003$; GSE: 47 meses vs 90 meses, $p = 0,002$); PARP2 (TCGA: 30 meses vs 65 meses, $p = 0,036$; GSE: 56 meses vs 95 meses, $p = 0,006$); PARP3 (TCGA: 37 meses vs 55 meses, $p = 0,003$; GSE: 64 meses vs 91 meses, $p = 0,001$). Essas observações são pioneiras no âmbito da LMA, sugerindo que a hiperexpressão de PARP1/2/3 pode contribuir para a falha do tratamento, além de poder ser um possível fator prognóstico a ser incorporado nos sistemas atuais de classificação.

Palavras-chave: PARPs; leucemia mieloide aguda; citogenética.

ABSTRACT

The impact of alterations in the expression of genes related to DNA repair, such as members of the PARP (Poly(ADP-ribose) polymerases) family, have been described as an important prognosis predictor in patients with several solid tumors, although there is not much information about its impact on patients with acute myeloid leukemia (AML). Aiming to evaluate the expression of *PARP1*, *PARP2* and *PARP3* genes and their impact on the clinical outcomes of adult patients with AML, 3 independent cohorts were analyzed: Recife: 81 patients (data obtained by RTq-PCR and Sybr Green methodology) and TCGA: 173 patients and GSE6891: 245 (data obtained from public databases). In the TCGA and GSE cohort, *PARP1/2/3* expression was higher in patients with complex karyotype ($p < 0.001$) and unfavorable risk ($p < 0.001$). In addition, elevated expression was associated with a significant decrease of the overall patient survival: *PARP1* (TCGA: 24 months vs 51 months, $p = 0.003$; GSE: 47 months vs 90 months, $p = 0.002$); *PARP2* (TCGA: 30 months vs 65 months, $p = 0.036$; GSE: 56 months vs 95 months, $p = 0.006$); *PARP3* (TCGA: 37 months vs 55 months, $p = 0.003$; GSE: 64 months vs 91 months, $p = 0.001$). These observations are pioneers in the field of AML, suggesting that the overexpression of *PARP1/2/3* may contribute to treatment failure, and also can be considered a possible prognostic factor to be incorporated into current classification systems.

Keywords: PARPs; acute myeloid leukemia; cytogenetics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	Leucemia mieloide aguda.....	11
2.2	Classificação	12
2.3	Diagnóstico.....	15
2.4	Marcadores de prognóstico	18
2.5	Fisiopatologia.....	21
2.6	Processo de ADP-ribosilação	23
2.7	Biopolímero Poli (ADP-Ribose).....	23
2.7.1	Estrutura de polímero PAR.....	23
2.7.2	Via cíclica do PAR	24
2.7.3	Poli ADP-ribosilação, metabolismo NAD + e morte celular	27
2.8	Família PARP	28
2.9	PARPs dependentes de dano ao DNA.....	29
2.9.1	Poly (ADP-ribose) polimerase I (PARP1)	29
2.9.1.1	PARP1, estrutura da cromatina e regulação da transcrição	30
2.9.1.2	PARP1 e reparo de DNA.....	31
2.9.2	Poly (ADP-ribose) polimerase II (PARP2)	32
2.9.3	Poly (ADP-ribose) polimerase III (PARP3)	34
2.9.4	PARP e câncer	36
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Casuística, tipo e local do estudo.....	39

4.2	Análise hematológica e clínica	40
4.2.1	Coleta de dados e das amostras	40
4.2.2	Critérios de inclusão	40
4.2.3	Critérios de exclusão	40
4.3	Análise molecular.....	41
4.3.1	Coleta de material	41
4.3.2	Extração de RNA total	41
4.3.3	Quantificação de ácidos nucleicos	42
4.3.4	Síntese da primeira fita de DNA complementar.....	42
4.3.5	Desenhos dos primers para qRT-PCR	43
4.3.6	Validações dos primers	43
4.3.7	Cálculo da eficiência de amplificação (E)	45
4.4	Análise de expressão gênica	46
4.5	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS	48
5.1	Caracterização dos pacientes.....	48
5.2	PARP1	49
5.2.1	Coorte Recife.....	49
5.2.2	Coorte TCGA.....	50
5.2.3	Coorte GSE	50
5.2.4	Impacto da expressão de <i>PARP1</i> no desfecho clínico dos pacientes LMA	53
5.2.4.1	Coorte Recife.....	53
5.2.4.2	Coorte TCGA.....	53
5.2.4.3	Coorte GSE	53
5.3	PARP2	55
5.3.1	Coorte Recife.....	55
5.3.2	Coorte TCGA.....	55

5.3.3	Coorte GSE	55
5.3.4	Impacto da expressão de <i>PARP2</i> no desfecho clínico dos pacientes LMA	58
5.3.4.1	Coorte Recife	58
5.3.4.2	Coorte TCGA.....	58
5.3.4.3	Coorte GSE	58
5.4	PARP3	60
5.4.1	Coorte Recife.....	60
5.4.2	Coorte TCGA.....	60
5.4.3	Coorte GSE	60
5.4.4	Expressão seu impacto no desfecho clínico dos pacientes LMA	64
5.4.4.1	Coorte Recife.....	64
5.4.4.2	Coorte TCGA.....	64
5.4.4.3	Coorte GSE6891	64
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é um grupo heterogêneo de doenças de rápida progressão e de natureza clonal. Tal entidade se caracteriza por alterações genéticas nos progenitores da linhagem mieloide, levando a uma proliferação exacerbada dos mesmos e incapacidade de se diferenciarem terminalmente e de responderem aos reguladores naturais de morte celular. Consequentemente, estas células imaturas (mieloblastos) se acumulam na medula óssea e substituem o tecido Hematopoiético normal por um tecido leucêmico, levando a uma produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais. Essas células leucêmicas frequentemente são liberadas para o sangue periférico e podem infiltrar outros sistemas orgânicos.

Segundo a *American Cancer Society* (ACS), a LMA geralmente acomete pessoas idosas, sendo incomum ocorrer antes dos 45 anos de idade. Possui uma incidência anual de 3,5 casos para cada 100.000 habitantes, o que a torna uma doença relativamente rara. No Brasil não existem dados epidemiológicos da LMA, uma vez que o Instituto Nacional do Câncer coleta e relata dados referentes às leucemias de forma geral e não exclusivamente da LMA.

A estratificação de risco LMA demonstra ter um papel fundamental para a avaliação prognóstica dos pacientes, visto que possibilita a predição do curso clínico dos pacientes, e assim, ter-se-ia melhores direcionamentos terapêuticos para cada caso. De pronto, sabe-se que vários fatores são relevantes para determinar o prognóstico dos pacientes. Contudo, alterações genéticas estruturais ao diagnóstico constituem o principal fator prognóstico independente da LMA, ocorrendo em torno de 55% dos casos. Em contrapartida, quase metade dos pacientes com LMA não apresentam alterações genéticas estruturais, constituindo-se como um grupo com cariótipo normal (LMA-CN). De acordo com os critérios de classificação da *European LeukemiaNet* (ELN), estes pacientes são considerados de risco intermediário, e como tal, apresentam uma significativa heterogeneidade clínica. Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares pode ser usado como uma ferramenta para estratificações subjacentes.

Neste sentido, merecem destaque os membros da família PARP (do inglês, *Poly(ADP-ribose) polymerases*) (*PARP1*, *PARP2* e *PARP3*), genes comumente

hiperexpressos em diversos tumores humanos, incluindo neoplasias hematológicas. Tais genes são responsáveis por codificar enzimas capazes de exercer modificações pós-traducionais em proteínas associadas ao reparo de danos ao DNA. Apesar dos níveis de expressão aberrantes destes genes terem sido associados a um pior prognóstico em diversas neoplasias em humanos, pouco se sabe do seu impacto na LMA.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de expressão de *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* e seus impactos nos pacientes com LMA. O estudo possibilitará um melhor entendimento da doença, gerando resultados que, possivelmente, poderão contribuir para uma melhor estratificação dos pacientes.

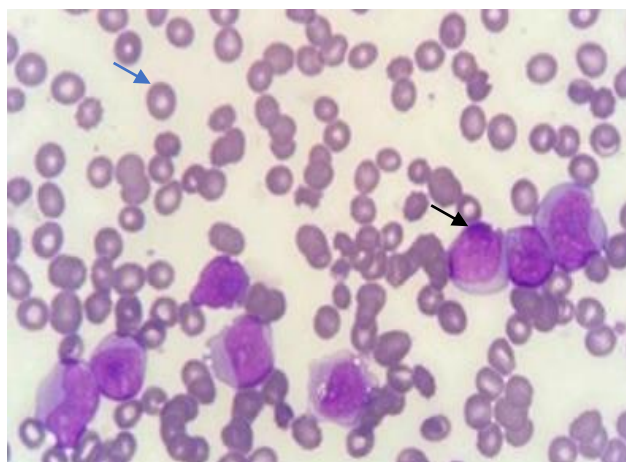
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucemia mieloide aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) representa um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas resultantes da proliferação descontrolada de células progenitoras da hematopoiese e da inibição da diferenciação no compartimento das células-tronco que resulta na acumulação de células imaturas não funcionais denominadas mieloblastos leucêmicos (figura 1), (ESTEY, 2013). O acúmulo de células imaturas tem seu início na medula óssea, podendo atingir o sangue periférico, assim como se infiltrar em outros sistemas orgânicos. Essa multiplicação descontrolada de blastos leva a uma substituição do tecido hematopoiético normal, provocando o aparecimento de citopenias (FERRARA, 2013).

Figura 1 - Esfregaço de sangue periférico de paciente com leucemia mieloide aguda.

Seta azul: hemácia; seta preta: Blasto.



Fonte: imagem cedida pelo NHCL.

A LMA representa cerca de 25% de todas as leucemias e é a forma mais comum de leucemia aguda observada em adultos (DESCHLER, 2006), contrastando com menos de 15% das leucemias em crianças (LINET e DEVESA, 2002). Em média, o paciente apresenta a doença entre a 6ª e 7ª década de vida, sendo três homens afetados para cada duas mulheres (DÖHNER, 2017). De acordo com a *American Cancer Society* (ACS), estima-se cerca de 19.940 novos casos de LMA nos Estados Unidos para 2020, com cerca de 11.180 mortes. A maioria deste serão em adultos (ACS, 2020). O Instituto Nacional de Câncer

(INCA) estimou, para 2020, cerca de 10.810 casos de leucemias, sendo 5.920 homens e 4.890 mulheres, incluindo adultos e crianças, no Brasil. Todavia, o INCA não relata dados específicos referentes à LMA, apenas às leucemias em geral, o que torna sua incidência no Brasil ainda desconhecida (INCA, 2020).

2.2 Classificação

Até a década de 1970, as leucemias agudas eram divididas em leucemias linfóides, não linfóides e monocíticas. O primeiro sistema de subclassificação da LMA a ser amplamente aceito foi o proposto pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) em 1976, baseando-se em critérios de imunofenotipagem, semelhança citomorfológica da célula normal com o seu equivalente leucêmico e citoquímica, tendo em vista que os blastos mielóides podem apresentar precocemente as enzimas mieloperoxidase (MPO) e esterase, que ocorrem apenas em células de linhagem mielóide. Tendo sido arbitrado pela FAB que a presença de pelo menos 3% das células blásticas mieloperoxidase positiva caracterizaria uma leucemia aguda como LMA (BENNETT et al., 1976). Dessa forma, definiram-se oito subtipos de LMA (M0-M7) que refletiam o grau de maturação e a linhagem celular comprometida:

- M0 - LMA sem diferenciação morfológica;
- M1 - LMA com mínima diferenciação morfológica;
- M2 - LMA com diferenciação granulocítica;
- M3 - LMA Promielocítica hipergranular e LMA M3v ou Promielocítica variante;
- M4 - LMA Mielomonocítica (com células monocíticas $\geq 20\%$);
- M5 - LMA Monoblástica ou Monocítica
 - M5a – LMA monoblástica (sem diferenciação, blastos $\geq 80\%$)
 - M5b – LMA monocítica (com diferenciação, blastos $< 80\%$)
- M6 – Eritroleucemia e variante;
- M7 ou Megacarioblástica:

Todavia, tal classificação tornou-se obsoleta por não incorporar os achados citogenéticos e moleculares que são parâmetros de grande importância clínica e biológica para a doença, além de não identificar subtipos clinicamente relevantes.

Nas últimas décadas os estudos referentes às alterações citogenéticas e moleculares na patogenia da LMA foram intensificados, tornando-se cada vez mais notável a heterogeneidade a nível molecular (GRIMWADE; HILLS, 2009). Em 2001 surgiu uma nova classificação subsidiada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), refletindo uma mudança nos esquemas anteriores, pois, pela primeira vez, a informação genética seria incorporada ao diagnóstico (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2009). No entanto, notou-se que poucas leucemias são morfologicamente identificáveis por associação a anormalidades citogenéticas específicas, como é o caso da leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17). Ademais, 50-55% dos casos apresentam cariótipo normal, apresentando nenhuma alteração citogenética (LMA-CN) (GRIMWADE et al., 1998; GRIMWADE et al., 2010; MROZEK et al., 2001; BYRD et al., 2002; NIMER, 2008). Descobertas essas que tornaram esse sistema de classificação deficiente. Em 2016, a OMS atualizou a classificação das neoplasias mieloides, estratificando a doença em diversas subcategorias (Quadro 1), definindo informações citoquímicas, imunofenotípicas e aspectos genético-moleculares da LMA. Nesta atualização, manteve-se o que já havia sido determinado em 2001, sendo fixada em 20% a porcentagem de blastos necessários para se concluir o diagnóstico de LMA tanto no sangue periférico (SP) quanto na medula óssea (MO). Também foi postulado que, uma vez apresentando alterações citogenéticas recorrentes da LMA, mesmo com menos de 20% de blastos, a LMA é diagnosticada.

Mais recentemente, a análise minuciosa das anormalidades clonais dos cromossomos em células de pacientes com leucemia teve um profundo impacto na compreensão das mudanças moleculares envolvidas na leucemogênese, como mutações e alterações na expressão gênica, permitindo o refinamento da estratificação dos pacientes, especialmente no grupo LMA-CN (LOOK, 2005).

Dentre as anomalias genéticas recém-descobertas, três mutações têm recebido especial atenção, sendo elas: mutações nos genes *NPM1*, *CEBPA* e duplicações internas em tandem do gene *FLT3* (FLT3-ITD), que, apesar de, originalmente, terem sido descritas como marcadores relevantes para o prognóstico de pacientes com cariótipo normal, também demonstram importância no subgrupo associado a rearranjos cromossômicos (FALINI et al., 2005; THIEDE et al., 2006; DOHNER et al., 2017; FALINI et al., 2011).

Com base na classificação atual, as alterações genéticas mais caracterizadas são definidas na categoria “LMA com anormalidades genéticas recorrentes”, e compreendem de 60 a 65% de todos os casos de LMA (VARDIMAN et al., 2009; DOHNER et al, 2017). A OMS também sugere uma mudança do caráter provisório da categoria de LMA com mutação no gene *NPM1* e *CEBPA* para caráter distinto e, no caso do *CEBPA*, apenas sua mutação bialélica detém valor prognóstico. Segundo a mesma, foram adicionados dois novos subtipos de caráter provisório: LMA com mutação no *RUNX1* e a LMA com *BCR-ABL1* (ARBER et al., 2016; DOHNER et al., 2017; KANSAL, 2016).

Quadro 1 - Sistema de Classificação da OMS de 2016 para a LMA e neoplasmas relacionados

LMA com anormalidades genéticas recorrentes

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

LMA com inv(6)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*

LPA com t(15;17)(q22;q12); *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(EVI1)*

LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MLK1*

Entidade provisória: LMA com *BCR-ABL1*

LMA com mutação no *NPM1*

LMA com mutação bialélica do *CEBPA*

Entidade provisória: LMA com mutação no *RUNX1*

LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia

Neoplasias mieloides relacionadas a terapia

LMA não categorizada nos itens anteriores

LMA com diferenciação mínima

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia mielomonocítica aguda

Leucemia monoblástica/monocítica aguda
 Leucemia eritroide pura
 Leucemia megacarioblástica aguda
 Leucemia basofílica aguda
 Pan-mielose aguda com mielofibrose

Sarcoma mieloide

Proliferações mieloides relacionadas a síndrome de Down

Mielopoesse anormal transiente
 Leucemia mieloide associada com síndrome de Down

Neoplasma blástico de células dendríticas plasmocitóides

Fonte: ARBER et al., 2016; DOHNER et al., 2017 (adaptado).

2.3 Diagnóstico

Geralmente, o diagnóstico de LMA inicia-se a partir de uma suspeita clínica e baseia-se na avaliação do sangue periférico e da medula óssea (BAIN, 2003). Ao hemograma, apresenta-se mais comumente como uma anemia normocítica/normocrômica, sendo comum a presença de policromasia (presença de eritrócitos jovens, com RNA citoplasmático e organelas remanescentes) e até de eritroblastos circulantes, acompanhada de plaquetopenia e neutropenia com percentual de blastos acima de 20% (FERRARA et al. 2004). No mielograma, observa-se infiltração medular por blastos leucêmicos, redução na quantidade de células de outras linhagens, podendo apresentar displasia. Sendo indicada a biópsia de medula óssea em ocasiões em que o mielograma não seja possível ser obtido devido a intensa fibrose medula. Ocasões como esta ocorrem principalmente em leucemias secundárias às síndromes mieloproliferativas e LMA M6.

As colorações citoquímicas (Quadro 2) usadas no diagnóstico e na classificação das leucemias podem ser aplicadas tanto à medula óssea quanto ao sangue periférico. De mesmo lado, são utilizadas para promover a distinção entre as células de origem mieloide e linfóide e, assim, auxiliam na diferenciação entre LLA e LMA. Tal técnica ainda é bastante útil no diagnóstico das LMA, mesmo com os progressos da imunofenotipagem (HENRY, 1995). As principais colorações

em uso são fosfatase alcalina; fosfatase ácida; mieloperoxidase (MPO); cloroacetato esterase (CAE); esterases inespecíficas, como alfa-naftil acetato esterase (ANAE); sudan black e naftol AS-D; reação do ácido para-aminossalicílico (ácido periódico de Schiff [PAS]) (BAIN, 2003).

Quadro 2 - MPO: mieloperoxidase; SBB: Sudan black B; ANAE: alfa-naftil acetatoesterase; NaF: fluoreto de sódio; (+): positivo; (-): negativo.

Colorações citoquímicas	
M0	MPO- ; SBB- ; esterases
M1	MPO/SBB+ em $\geq 3\%$ das células
M2	MPO+ ; SBB+
M3	MPO++; SBB++
M4	MPO+ ; SBB+ ; esterase inespecífica+ com inibição pelo NaF; ANAE+
M5	MPO- ; esterase++
M6	MPO- ; SBB- ; ANAE++
M7	MPO- ; SBB- ; ANAE+ na zona de Golgi

Fonte: adaptado de Yamoto et al., 2000.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) faz-se necessários para o diagnóstico da LMA: citoquímica e morfologia tanto da medula óssea, quanto do sangue periférico; imunofenotipagem, citogenética da medula óssea e marcadores moleculares do sangue periférico e medula óssea.

A imunofenotipagem é realizada por meio de anticorpos monoclonais marcados, que reconhecem epítomos específicos de antígenos celulares (SILVA, 2006). Além disso, permite reconhecer o clone anormal, definir a linhagem, prognóstico, tratamento e investigação de doença residual mínima (DRM) (PELLOSO, 2003, pg.150).

O **Quadro 3** traz os principais marcadores imunofenotípicos relacionados aos subtipos de LMA.

Quadro 3 - Classificação da imunofenotipagem da LMA. -: < 10% das leucemias são positivas; ±: 10%-25% das leucemias são positivas; +: 25%-75% das leucemias são positivas; ++: > 75% das leucemias são positivas.

Marcadores	M0/M1/M2	M3	M4/M5a/M5b	LMA-M6	LMA-M7
CD13/CD33	++	++	++	+	+
CD65	±/+/++	+	++	±	±
MPO	-/+/±	++	++	+	-
CD11c	- ou ±	-	++	-	-
CD14	-	-	+ / + / ++	-	-
CD15	±/±/++	±	-	-	-
CD36	-	-	+	++	+
H-antígeno	-	-	-	++	+
CD235a					
Glicoforina A	-	-	-	+	-
CD41/CD61	-	-	-	-	++
CD42	-	-	-	-	+
CD34	++/++/+	±	±/+/±	+	++
CD117	++	+	+	+	+
HLA-DR	++/++/+	-	++	+	++
TdT	+	±	+	+	±

Fonte: adaptado de Szczepanski et al., 2003.

A citogenética e os estudos moleculares são instrumentos, frequentemente, utilizados para constatar anomalias dentro do clone leucêmico, podendo sugerir o diagnóstico e/ou o prognóstico (LIESNER, 2004; HALL, 2001). Desta forma, esta

ferramenta tem contribuído para a classificação das LMA mostrando a correlação frequente entre os tipos FAB-M2 e a translocação (8,21) (q22;q22.1), o M3 e a translocação (15;17) (q22;q12), o M4 com eosinofilia e a inversão (16) (p13.1q22) e o M5a com a translocação (11) (LORENZI, 2005, pg. 113).

A análise de genética molecular baseia-se na análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio de técnicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), ou na análise do ácido ribonucleico (RNA) por PCR da transcriptase reversa (RT-PCR), podendo também ser por PCR em tempo real (RQ-PCR) (ARBER et al., 2016).

2.4 Marcadores de prognóstico

Estes podem ser subdivididos entre fatores relacionados à condição de saúde geral do paciente e àqueles relacionados às características da célula leucêmica. Os fatores do primeiro grupo são relevantes na predição da mortalidade relacionada ao tratamento, principalmente com o avanço da idade do paciente, enquanto que os do segundo grupo são relacionados aos preditivos da resistência à terapia convencional (DOHNER *et al.*, 2017).

A idade tem sido continuamente descrita como o fator preditor mais importante. O prognóstico tende a piorar com a idade, uma vez que, com o aumento da idade, aumentam as chances de ocorrência de alterações cromossômicas, leucemia secundária e outros fatores que conferem um pior prognóstico a resposta terapêutica (SEKERES; STONE, 2002).

Os fatores prognósticos relacionados à LMA incluem a leucometria, origem da leucemia (*de novo* ou secundária), evolução a partir de síndrome mielodisplásica e processos quimioterápicos relacionados ao tratamento de muitas desordens malignas. A hiperleucocitose (>100,000 no sangue periférico) tem sido associada a um prognóstico desfavorável devido à elevada morte precoce e ao alto risco de recaída (GREENWOOD *et al.*, 2006).

No final dos anos 50, surgiram as primeiras descrições cariotípicas relacionadas à LMA, antes mesmo de ser possível a identificação individual de cromossomos humanos. No início da década 70, quando deram início aos primeiros estudos de bandeamento, descobriu-se que aproximadamente metade dos pacientes com a neoplasia possuíam aberrações clonais (HEIM e

MITELMAN, 1995). Dessa forma, o cariótipo do indivíduo torna-se um dos mais importantes fatores prognósticos na LMA, permitindo a identificação de entidades biologicamente distintas dentro do grande número de alterações citogenéticas que essa doença pode apresentar (GRIMWADE et al., 1998; GRIMWADE et al., 2010; MROZEK et al., 2001; BYRD et al., 2002).

Além disso, os achados citogenéticos são também preditivos da evolução clínica dos pacientes, de modo que categorias que levam em consideração a sobrevida global, o risco de recaída e a responsividade ao tratamento são propostas: favorável, intermediário e adverso. Por esse motivo, o uso da citogenética vem sendo amplamente recomendado ao diagnóstico por grupos colaborativos multicêntricos e agências reguladoras para guiar a indicação de transplante de medula óssea em primeira remissão completa (GRIMWADE et al., 2010; VARDIMAN et al., 2009).

Na categoria de pacientes classificados como favoráveis, não é indicado o transplante em primeira remissão. Para tais pacientes, o tratamento realizado é o convencional com indução pelo regime 7+3, assim denominado porque ele combina o uso da citarabina (ara-C) por 7 dias, com o da antraciclina (daunorubicina, idarubicina ou mitoxantrone) por 3 dias (DOHNER et al., 2017; KOUCHKONVISKY; ABDUL-HAY, 2016) e a consolidação é feita em regimes de dois a quatro ciclos com altas doses de citarabina (em inglês high-dose ara-C – HiDAC) (KOUCHKONVISKY; ABDUL-HAY, 2016; SAULTZ; GARZON, 2016).

Esta afirmação se baseia em estudos multicêntricos nos quais a leucemia promielocítica aguda associada à t(15;17) ou PML/RARA, (q22;q21) e as leucemias *core-binding factor* (LMA-CBF), com t(8;21) ou ETO/AML1 (*RUNX1/RUNX1T1*), ou inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22) (*CBFB-MYH11*), foram classificadas no grupo de prognóstico favorável. Indivíduos estratificados nesta categoria apresentam sobrevida global em cerca de 5 anos e cujas taxas de remissão completa são frequentemente superiores a 90% (GRIMWADE et al., 1998; GRIMWADE et al., 2010; SLOVAK et al., 2000; MROZEK; BLOOMFIELD, 2008).

Em contrapartida, indivíduos que apresentam alterações citogenéticas como inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26), -7, cariótipo complexo e rearranjos envolvendo 11q23, são estratificados no grupo de pacientes com prognóstico adverso, tornando-se os principais candidatos a transplante em primeira

remissão, uma vez que apenas cerca de 12% deles estarão vivos em 5 anos (GRIMWADE et al., 1998; GRIMWADE et al., 2010; BREEMS et al., 2008).

No prognóstico intermediário, estão os pacientes com alterações relativamente raras, além dos com cariótipo normal LMA-CN que correspondem a 50 a 55% dos casos de LMA. Pacientes classificados com prognóstico intermediário são considerados com um prognóstico consideravelmente variável, visto que uma parte dos mesmos são portadores de alguma anormalidade citogenética não enquadrada nas demais categorias e marcante heterogeneidade no que se diz respeito à responsividade ao tratamento (GRIMWADE et al., 2010). Demonstrando a grande importância de estudos a respeito da identificação de subtipos dentro desse grupo, cujas características biológicas, fisiopatológicas e evolução clínica sejam semelhantes, auxiliando na escolha da melhor abordagem terapêuticas e maiores chances de sucesso.

Em resposta a isso, várias mutações foram descritas como marcadores para um melhor refinamento na estratificação desse grupo, apresentando impacto no prognóstico desses pacientes. Dentre elas, as mais bem estudadas são as mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* (ANDERSSON et al., 2004; MROZEC et al., 2012; ROCKOVA et al., 2011; VELLOSO et al., 2011). Diante da importância dessas mutações no prognóstico dos pacientes LMA-CN, o grupo *European Leukemia Net*, em 2017 (Quadro 4), propôs uma estratificação que levou em consideração o prognóstico conferido por seus cariótipos e, nos casos de LMA-CN, pela associação destes aos marcadores moleculares.

Quadro 4 - Sistema de estratificação de risco do grupo ELN de 2017. O baixo e o alto se referem a variação da frequência alélica do *FLT3-ITD*.

Categoria de risco	Anormalidade Genética
Favorável	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> Inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i>^{baixo} Mutação bialélica no <i>CEBPA</i>
Intermediário	<i>NPM1</i> mutado com <i>FLT3-ITD</i>^{alto} <i>NPM1</i> selvagem sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i>^{baixo}

Adverso	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
	Anormalidades citogenéticas que não possuem risco favorável nem adverso
	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranjado
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	Inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i>
	-5 ou del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Cariótipo complexo, cariótipo monossômico
	<i>NPM1</i> selvagem com <i>FLT3-ITD^{alto}</i>
	Mutação no <i>RUNX1</i>
	Mutação no <i>ASXL1</i>
	Mutação no <i>TP53</i>

Fonte: DOHNER et al., 2017.

2.5 Fisiopatologia

As células-tronco são células que possuem um notável potencial de auto-renovação e proliferação, podendo se desenvolver em vários tipos de células diferentes no corpo. Em tecidos normais, processos como o crescimento e renovação tecidual ocorrem através da sua diferenciação em células maduras que apresentam propriedades bioquímicas e funcionais características. De acordo com a teoria das células troncos cancerígenas, a referida célula é alvo da carcinogênese e não as células somáticas maduras. Dessa forma, tais células cancerígenas podem ser definidas como células, de um tumor, que possui a capacidade de se autorrenovar e de formar linhagens heterogêneas de células neoplásicas (KRTOLICA ANA, 2013).

No que diz respeito à LMA, estudos epidemiológicos mostraram que a gênese da LMA demonstra ter caráter multifatorial, englobando fatores ambientais (radiação ionizante, exposição ao benzeno e seus derivados, quimioterápicos, etc.); genéticos (mutações, polimorfismos e aberrações cromossômicas), e epigenéticos (metilação de DNA e acetilação de histonas), (HOFFBRAND *et al.*,

2008). Sendo as características da célula leucêmica correlacionadas com as lesões genéticas que as causam. Apesar de ainda não terem sido descobertos todos os mecanismos envolvidos no processo leucêmico, sabe-se que muitos deles estão interligados e resultam na integração de múltiplas anomalias no genoma da célula leucêmica. Geralmente, aceita-se que os mecanismos básicos que levam ao início de tal processo são ligados a pelo menos dois eventos moleculares, sendo esses: eventos que resultam em um comprometimento da diferenciação de células-tronco hematopoiética e alterações na proliferação celular que conferem vantagens de sobrevivência aos progenitores hematopoiéticos (TAKAHASHI et al. 2011)

Como base nisso, Gilliland e Griffin sugeriram um modelo amplamente aceito relacionado à classificação das mutações encontradas em pacientes com LMA: aquelas que conferem vantagens proliferativas e/ou de sobrevivência aos progenitores hematopoiéticos, mas não afetam a diferenciação (mutações de classe I). Dessas são exemplos as mutações no gene *FLT3*, *ckIT* e *N-RAS*. E aquelas que afetam a transcrição ou componentes do complexo transcricional e prejudicam a diferenciação hematopoiética (mutações de classe II), como as mutações nos genes *NPM1* e *C/EBPA*, os rearranjos gênicos *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11*, *PML/RARA* e anormalidades no gene *MLL* (SPECK e GILLILAND, 2002; SCHLENK et al. 2008,; ANDERSEN et al, 2008).

Dessa forma, o acúmulo de mutações de classe I e II seria o responsável no desenvolvimento de progenitores hematopoiéticos alterados, capazes de propagar o fenótipo leucêmico. No entanto, os mieloblastos encontrados nos indivíduos leucêmicos apresentam um potencial proliferativo reduzido, sugerindo que subpopulações de células-tronco leucêmicas (CTL), com um alto potencial proliferativo e capacidade de autorrenovação, sejam as responsáveis por repovoar o microambiente a longo prazo, mantendo o fenótipo leucêmico (LAPIDOT et al., 1994; DICK et al, 1997). Entretanto, atualmente sabe-se que existem mutações que não se enquadram em nenhuma das duas classes, sugerindo a possibilidade deste modelo proposto não ser o mais adequado (CONWAY O'BRIEN et al, 2014).

2.6 Processo de ADP-ribosilação

Respostas celulares ao estresse são indispensáveis para a manutenção da estabilidade genômica em eucariotos, durante a qual uma série de processos regulatórios nos níveis genômico, transcricional, pós-transcricional, traducional e pós-traducional são empregados. A adição de polímeros carregados negativamente de ADP-ribose (PAR) é uma modificação pós-traducional única das proteínas nucleares e citoplasmáticas, sendo um processo dinâmico regulado por ações opostas de poli-ADP-ribose-polymerases (PARPs) e poli-ADP-ribose-glicohidrolase (PARG) (LEUNG, 2017). Durante o processo de ADP-ribosilação, moléculas de ADP-ribose são adicionadas sucessivamente a proteínas aceitadoras para formar polímeros, podendo esses variar de tamanho e ramificação, além de conferir diversos efeitos, tanto estruturais quanto funcionais a estas proteínas modificadas. Esta modificação em si é de curta duração, uma vez que estes polímeros podem ser sintetizados e degradados em segundos; contudo, é extensa, uma vez que as cadeias poliméricas podem atingir mais de 200 unidades em proteínas aceitadoras (ALVAREZ-GONZALEZ e JACOBSON, 1987; LEUNG, 2017).

A existência do polímero poli-ADP-ribose foi relatada pela primeira em 1963 (CHAMBON et al., 1963). Desde então, a importância da sua síntese foi estabelecida em muitos processos celulares, atuando não apenas nos programas de sobrevivência e morte celular, como também no metabolismo energético, a coesão dos telômeros, formação de fusos mitóticos durante a divisão celular, regulação transcricional e sinalização de dano ao DNA. Nas últimas décadas, a ADP-ribosilação por PARPs recebeu atenção considerável e foi investigada por seus papéis distintos na manutenção da integridade genômica (LEUNG, 2017).

2.7 Biopolímero Poli (ADP-Ribose)

2.7.1 Estrutura de polímero PAR

Os polímeros de ADP-ribose, designados em toda a literatura como PAR, foram descobertos há mais de 50 anos (CHAMBON et al., 1963). PAR é um polímero heterogêneo de unidades repetidas de ADP-ribose, com um

comprimento que pode chegar a 200 unidades de ADP-ribose, sendo chamados de oligo-ADPr quando apresentam comprimento menor que 11 unidades ADPr (TANAKA et al. 1977).

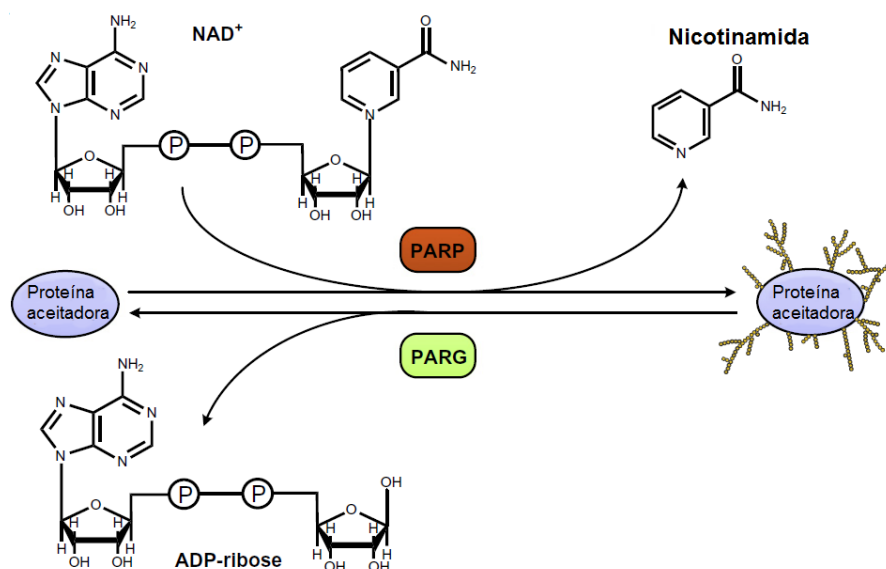
Minaga e Kun propuseram que longas cadeias de ADPr possuem uma estrutura secundária helicoidal, como o DNA. No entanto, diferentemente do DNA ou RNA, as unidades de ADP-ribose estão ligadas através de ligações ribose-ribose únicas (MIWA et al., 1979, MINAGA et 1983). Parecido com os ácidos nucleicos e polissacáridos, PAR contém uma cadeia linear de unidades ADP-ribose ligadas por meio de de ligações glicosídicas, todavia, distintamente daqueles, PAR geralmente contém pontos de ramificação, o que leva ao aumento de sua complexidade. Segundo Althaus et al, este aspecto do PAR, aparentemente, é essencial para uma maior afinidade de ligação com proteínas alvo do que a ligação destas proteínas ao DNA (ALTHAUS et. 1995).

Após sua síntese, acredita-se que PAR sejam ligados aos seus alvos proteicos em sua maior parte através dos grupos γ -carboxi de resíduos de ácido glutâmico e, em menor frequência, a outros resíduos, como resíduos de ácido aspártico (BURZIO et al., 1979). Tal processo cria, então, uma modificação única pós-tradução de proteínas alvo (SUZUKI et al., 1986).

2.7.2 Via cíclica do PAR

A rápida síntese e degradação do PAR permite um controle preciso sobre a modificação de proteínas-alvo, resultando em mudanças na fisiologia celular. PAR é sintetizado pelas PARPs utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) como substrato, onde esse doa uma molécula de ADP-ribose e libera, simultaneamente, uma de nicotinamida (Fig. 2) (OKAYAMA et al., 1977).

Figura 2 - Via anabólica de poli (ADP-ribose). O processo de poli ADP-ribosilação é catalisado pelas poli (ADP-ribose) polimerases (PARPs), que adicionam unidades ADPribose a proteínas aceitadoras.



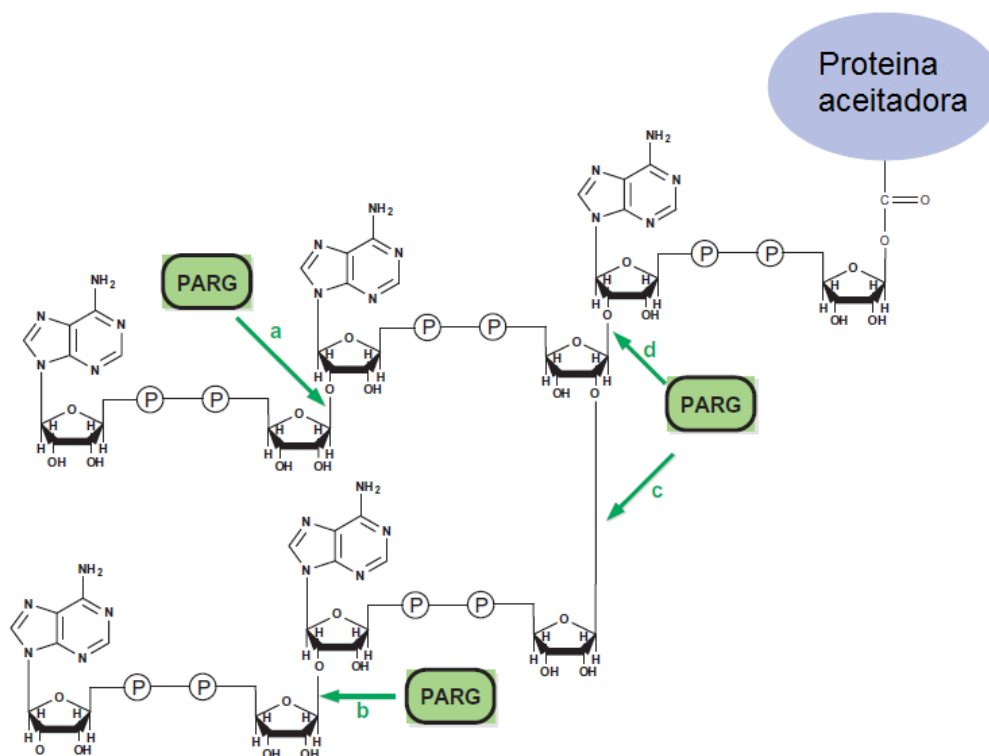
Fonte: Feng et al., 2013.

Seus níveis constitutivos são geralmente muito baixos em células que não estão passando por estresse celular, devido à baixa atividade enzimática da PARP (FERRO et al. 1978; KREIMEYER et al. 1984). Na ausência de dano ao DNA, a maioria das unidades ADPr encontra-se ligadas a proteínas aceitadoras, sendo qualitativamente distintas daquelas sintetizadas na presença de dano ao DNA, possuindo degradação muito mais lenta (ALVAREZ-GONZALEZ et al., 1987).

Na presença de quebras na cadeia de DNA, a atividade da PARP pode aumentar de 10 a 500 vezes, implicando aumento dos níveis de PAR e, consequentemente, redução dos níveis de NAD⁺ (JUAREZ-SALINAS et al., 1979). De acordo com ALTHAUS et al, o dano ao DNA estimula a atividade de PARP, sendo a síntese de PAR diretamente proporcional ao número de quebras de fita simples e de duplas fita contidas no DNA genômico. Ademais, ambos os níveis constitutivos de PAR e os estimulados por dano ao DNA estão correlacionados à concentração de NAD⁺ celular (LOETSCHER et al. 1987; COPPOLA et al., 1995).

Os PARs são rapidamente degradados pela PARG (do inglês, Poly (ADP-ribose) glycohydrolase) *in vivo*, caracterizando sua natureza transitória em células vivas. A PARG é uma enzima que possui atividades de exo e endoglicosidase, catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas entre as unidades ADP-ribose e a liberação de oligômeros PAR (atividade endoglicosídica) ou ADPribose livre (atividade exoglicosídica) (Figura 3). Também foi demonstrado que uma proteína do tipo ADP-ribose hidrolase (ARH3) é capaz de hidrolisar PARs em menor extensão, sugerindo uma possível contribuição da ARH3 no catabolismo de PAR (BROCHU et al., 1994; OKA et al., 2006).

Figura 3 - Via catabólica de poli (ADP-ribose). A (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG) catalisa a reação inversa, com a hidrólise de PAR para produzir ADP-ribose livre. O PARG possui atividade exoglicosídica (aeb), que produz ADP-ribose e atividade endoglicosídica (c e d), que produz PAR livre.



Fonte: Feng et al., 2013

A degradação de PAR ocorre em função da sua concentração celular. De fato, estudos demonstraram que a ativação substancial de PARG requer uma concentração de PAR maior que 5 μM *in vivo*, o que poderia explicar o curto tempo de meia-vida de polímeros sintetizados em resposta a quebra do DNA, em

comparação com o maior tempo de meia-vida de polímeros (constitutivos) em células não estimuladas (WIELCKENS et. 1982; ALVAREZ-GONZALEZ et. 1989). Além disso, foi demonstrado que polímeros ramificados e curtos são degradados de forma mais lenta que polímeros longos e lineares. Desta forma, esta preferência por alguns tipos de cadeias de ADPr pela PARG poderia também esclarecer a existência de duas populações de polímeros com meias-vidas diferentes após danos no DNA. Uma vez liberados do polímero, as unidades ADPr são catabolizadas para AMP e ribose 5- fosfato pelas ADPR pirofosfatases (MIRO et 1989; FERNANDEZ et. 1996)

2.7.3 Poli ADP-ribosilação, metabolismo NAD + e morte celular

O NAD + é um cofator essencial no metabolismo energético celular, como no caso da síntese de ATP (VOET et al., 1995). Além disso, o NAD + é também substrato para a síntese de PAR. A energia da hidrólise da ligação N-glicosídica entre a nicotinamida e as porções ribose de NAD +(- 8,2 kcal/ mol) é utilizada pelas PARPs para catalisar a síntese de polímeros ADPr. Acredita-se que o processo de ADP-robosilação tenha uma grande importância na manutenção dos níveis de NAD +, sendo o principal responsável pelo catabolismo de NAD + em células de mamíferos (HILLYARD et al. 1981; WIELCKENS et al., 1983).

Diversos estudos demonstraram que células tratadas com diferentes agentes que danificam o DNA, tais como N-metilnitrosourea (SKIDMORE et al., 1979), estreptozotocina (WHISH et al. 1975) e H₂O₂ (SCHRAUFSTATTER et al. 1886), sofrem uma diminuição em seus níveis de NAD +. Doses moderadas ou fracas de agentes genotóxicos podem culminar na diminuição de cerca de 70% dos níveis de NAD+, contudo apenas doses muito altas dos mesmos agentes são capazes de levar a depleção residual dos 30% (GOODWIN et al. 1978; SKIDMORE et al. 1979; RANKIN et al. 1980).

Esta redução não está associada a uma diminuição na biossíntese de NAD +, como outrora suposto. Mas, sim, associada a uma elevação da atividade da PARP (SKIDMORE et al. 1979; WIELCKENS et al. 1982) e, conseqüentemente, a um acúmulo de polímeros ADPr nas células (JUAREZ-SALINAS et al. 1979; BENJAMIN et al. 1980). Ademais, também foi demonstrado que a depleção de

NAD⁺ induzida por dano ao DNA levaria a uma depleção nos níveis ATP e dGTP. Como a ressíntese de NAD⁺ requer moléculas de ATP, isso justificaria a queda dos níveis de ATP. Outrossim, a depleção de NAD⁺ bloqueia a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que é necessária para ressintetizar o ATP durante a glicólise (GOODWIN et al. 1978; DAS et al., 1986).

Além de acarretar grande consumo de NAD⁺ celular, o acúmulo de PAR diante da ativação excessiva de PARP1, devido a um grau muito elevado de dano ao DNA, por exemplo, leva a um programa único de morte celular programada denominado partanatos. Esta morte celular difere da apoptose, uma vez que é um processo independente de caspase, além de promover grande fragmentação do DNA. Da mesma forma, difere da necrose, pois não leva a uma tumefação celular, ainda que culmine em perda da integridade das membranas, assim como, manifestação de reação inflamatória, fato observado na necrose (WANG et al, 2019, WANG et al., 2016).

2.8 Família PARP

A família PARP (do inglês, *poly (ADP-ribose) polymerases*) é uma família de enzimas que compartilham a capacidade de catalisar a transferência de ADP-ribose de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) para substratos proteicos (heteromodificação), incluindo as próprias PARPs (isto é, automodificação). Há 17 PARPs em humanos, sendo codificadas por diferentes genes, compartilhando homologia em um domínio catalítico conservado. Esta nomenclatura, no entanto, pode ser um equívoco, uma vez que apenas 4 das 17 PARPs são capazes de formar polímeros de ADP-ribose (poli ADP-ribosilação); do restante, 11 conjugam uma única unidade ADP-ribose em cada resíduo modificado (mono ADP-ribosilação), e 2 são cataliticamente inativas (LEUNG et al., 2017).

Embora certas isoformas como PARP1, PARP2 e PARP3 sejam mais conhecidas por seu envolvimento em processos de reparo de DNA, está evidente que essas e outras PARPs têm um papel importante em vários processos celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e morte celular (AMÉ et al, 2004). Mais de 30 substratos nucleares de PARPs foram identificados *in vivo* e *in vitro*, sendo a maioria destas proteínas nucleares envolvidas no metabolismo de

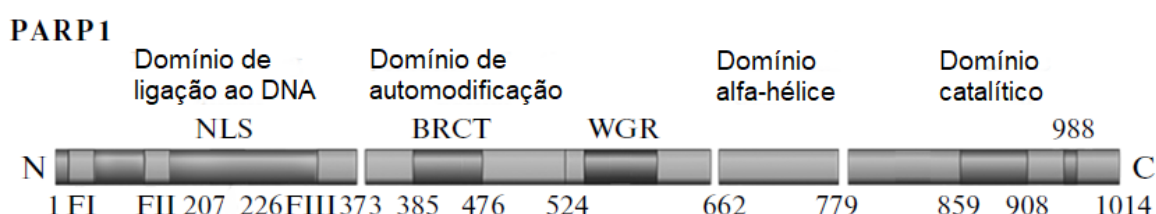
ácido nucleico, modulação da cromatina, síntese e reparo do DNA. A PARP ainda pode se automodificar na presença de quebras no DNA, sendo um dos principais receptores de poli ADP ribose in vivo (D'AMOURS et, 1999).

2.9 PARPs dependentes de dano ao DNA

2.9.1 Poly (ADP-ribose) polimerase I (PARP1)

A proteína PARP1 tem uma organização estrutural e funcional conservada, englobando seis domínios funcionais: dois domínios homogêneos de zinco, Zn1 e Zn2 implicado na detecção de dano no DNA, um terceiro domínio de ligação ao zinco, Zn3 que se liga a quebras da cadeia dupla do DNA (LANGEIER et al., 2012), um domínio BRCT envolvido em interações proteína-proteína que possibilita que outras proteases contendo domínio BRCT (por exemplo, XRCC-1) se associem a PARP1 e um domínio WGR que se localiza na região central, possibilitando a comunicação entre os diferentes domínios e com o DNA e o domínio catalítico em si que se liga ao NAD⁺ e catalisa a transferência de ADP-ribose (Figura 4) (LANGEIER et al. 2011; EUSTERMANN et al. 2011).

Figura 4 - composição dos domínios da proteína PARP1. FI, FII, FIII são domínios de zinco; BRCT, domínio C-terminal de automodificação (*breast cancer 1*); WGR é um domínio cuja função é desconhecida; NLS é sinal de localização nuclear.



Fonte: Adaptado de Kutuzov, 2014

No que diz respeito aos seus substratos de ação, a proteína aceitadora primária da ADP-ribosilação por PARP1 é a própria PARP1. Até o momento, uma gama de outras proteínas aceitadoras foram identificadas, sendo na sua maioria proteínas nucleares, incluindo histonas, ribonucleoproteínas, polimerases de DNA, RNA polimerases, topoisomerases, fatores de transcrição, ligases e outras proteínas de reparo de DNA (tais como DNAPKCS, XRCC-1, Ku70 / 80 e PCNA) (HASSA E HOTTIGER, 2008). Em vista dessa variedade de substratos, supõe-se que a PARP1 esteja relacionada a uma ampla diversidade de processos

celulares, como diferenciação, proliferação, dinâmica da cromatina, transcrição gênica, reparo de DNA e morte celular (HASSA E HOTTIGER, 2008; KIM et al., 2005; KRISHNAKUMAR E KRAUS, 2010). Diversos estudos experimentais knockout para *PARP1* em camundongos demonstraram que esses animais são viáveis e férteis, no entanto exibem hipersensibilidade à irradiação e um acúmulo de quebras nas cadeias de DNA, aumentando sua instabilidade genômica (DE MURCIA et al., 1997; WANG et al., 1997).

2.9.1.1 PARP1, estrutura da cromatina e regulação da transcrição

Uma vez que a estrutura da cromatina pode afetar diversos processos importantes, como transcrição, replicação e reparo do DNA, sua modulação pela PARP1 demonstra ser bastante importante. Após as histonas, PARP1 é a proteína de cromatina mais abundante e, embora suas ações tenham sido majoritariamente relacionadas a eventos ligados ao dano DNA, seu papel na regulação da estrutura da cromatina também se demonstra válido (DANTZER et al., 2013).

Estudos anteriores demonstraram que a poli-ribosilação de nucleossomos pela PARP1 leva a um relaxamento geral da estrutura da cromatina, regulando assim a acessibilidade e facilitando processos como a replicação do DNA, reparo e transcrição de DNA (POIRIER et al., 1982).

A partir de estudos em células de câncer de mama, Wright e colaboradores relataram que após estimulação hormonal, os PAR são hidrolisados à ADP-ribose, que é então convertida em ATP pela ação da enzima NUDIX5. Este experimento demonstrou que a energia necessária para o remodelamento da cromatina pode ser gerada localmente de forma induzida por hormônio com o intuito de ativar programas transcricionais importantes na regulação da proliferação celular (WRIGHT et al., 2016)

A proteína PARP1 atua como recrutadora e ativadora de proteínas, como Alc1, que é uma proteína envolvida no remodelamento da cromatina, sendo recrutada para locais de danos no DNA. Alc1 é alostericamente ativada pelo processo de ADP-ribosilação mediado pela PARP1, assim como suas atividades de ATPase e de remodelação da cromatina (GOTTSCALK et al. 2009).

A PARP1 também é capaz de ADP-ribosilar as próprias histonas. A H1 foi identificada como uma das principais receptoras de PAR. De acordo com experimentos realizados por Wright e colaboradores, em situações como o tratamento hormonal, a hiperexpressão da PARP1 causava o deslocamento de H1 da cromatina, tornando a cromatina mais aberta e passível de remodelação das regiões responsivas à progesterona (WRIGHT et al., 2012).

Desta forma, a ADP-ribosilação por PARP1 surge como um importante evento direcionando os remodeladores de cromatina para sítios nos quais a estrutura local de cromatina precisa ser alterada para adaptar o programa transcricional ou de reparo.

2.9.1.2 PARP1 e reparo de DNA

Quebras de fita simples de DNA são rapidamente detectadas pela PARP1. Em seguida a PARP1 catalisa a adição de PAR em si mesma ou em outras proteínas alvo. Supõe-se que a PARP1 ative o reparo de quebra de fita simples (SSBR - do inglês, *single-strand break repair*) pela promoção do acúmulo de componentes desta via de reparo ou sua estabilização no local do dano. A proteína XRCC1 (do inglês, *X-Ray Repair Cross Complementing 1*) é um fator central no suporte de proteínas SSBR, como DNA polimerase β e ligase III (LIG3), estimulando assim o processo de reparação ao dano (CALDECOTT et al. 1994; WHITEHOUSE et al., 2001).

O rápido recrutamento de XRCC1 para o local de quebra de fita simples é dependente de PARP1 ou PARP2 (HANZLIKOVÁ et al., 2017; CALDECOTT et al. 1994). Estudos experimentais em camundongos demonstraram que mutações em XRCC1 leva a SSBR deficiente e defeitos neuropatológicos correlacionados à hiperexpressão de *PARP1*, que surge por conta de quebras de fita simples não reparadas (HOCH et al. 2017). Este acúmulo de PARP1 tem como resultado a depleção de pools celulares de NAD⁺ e, consequentemente, a morte celular.

Já o reparo de quebra de dupla fita em células mamíferas ocorre de duas formas: Recombinação homologa (HR - do inglês, *homologous recombination*) e junção terminal não homologa (NHEJ - do inglês, *nonhomologous end joining*). O processo de HR envolve o cromossomo homólogo como modelo de reparo

preciso e se inicia com a ocorrência de quebras de fita simples, onde são ligadas proteínas de reparo, como o complexo Mrel1-Rad50-Nbsl (MRN) (HAKEM et al., 2008). Este complexo detecta a lesão e participa do início do reparo do DNA. No entanto, para iniciar a HR, foi demonstrado que o envolvimento das proteínas BRCA1 e BRCA2 também é necessário (JACKSON et al., 2009).

Outra via de reparo (NHEJ) é conhecida por duas vias principais distintas. Uma delas é a via clássica (C-NHEJ), que se inicia quando proteínas KU70/80 reconhecem a lesão e se ligam ao local de quebra do DNA, recrutando proteínas específicas de reparo como proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), XRCC1 e DNA ligase IV. Estudos experimentais demonstraram que defeitos nos componentes da via clássica aumentam as taxas de translocação, indicando que esses componentes normalmente reprimem as translocações (SIMSEK et al., 2010).

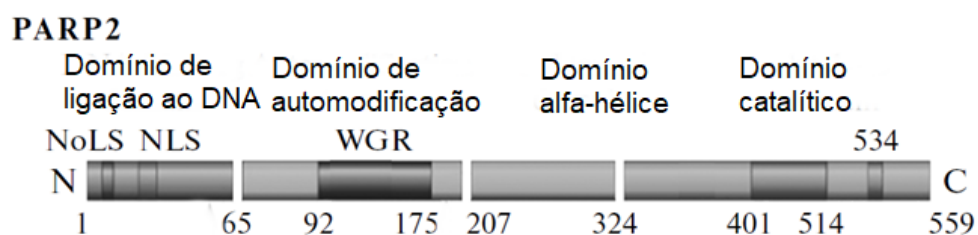
A via alternativa do NHEJ (Alt-NHEJ) se inicia com PARP1 reconhecendo uma quebra de dupla fita, competindo pelas extremidades de DNA livre com o complexo Ku de cNHEJ, e utiliza proteínas do reparo de excisão de base, como a XRCCI-DNA e ligase III (WANG et al., 2006). Dados de clonagem e sequenciamento de rearranjos cromossômicos, especialmente de translocações, mostraram forte assinatura de reparo por NHEJ. Diante disso, alguns autores correlacionam o aumento da expressão de PARP1 com o aumento da incidência de translocações (WRAY et al., 2013).

2.9.2 Poly (ADP-ribose) polimerase II (PARP2)

O *PARP2* é um gene contido no cromossomo 14 e acredita-se que a enzima codificada por ele seja responsável por apenas 10% da síntese total de PAR na célula. A enzima PARP2 compartilha um domínio PARP carboxi-terminal altamente conservado com PARP1, contudo, não possui um domínio de zinco, ligando-se preferencialmente a lacunas de nucleotídeo único (Figura 5) (AME et al., 1999). Nesse contexto, estudos bioquímicos e estruturais demonstraram que seus substratos apenas se sobrepõem parcialmente (ISABELLE et al., 2010; CARTER-O'CONNELL et al., 2014) e a análise da deleção do gene *PARP2* em camundongos revelou funções únicas para a PARP2 na diferenciação de

adipócitos, metabolismo celular, espermatogênese e outros processos (NICOLAS et al. 2010; LEGER et al. 2014). Além disso, a PARP2 tem capacidade de ADP-ribosilar predominantemente histonas H2A e H2B, em contraste com a proteína PARP1, que modifica a histona H1 (DANTZER et al. 2006).

Figura 5 - composição dos domínios da proteína PARP2. WGR é um domínio de função desconhecida; NLS é sinal de localização nuclear; NoLS é sinal de localização nucleolar.



Fonte: Adaptado de Kutuzov, 2014.

Experimentos com animais confirmaram o envolvimento de PARP2 em assegurar a estabilidade do genoma. Tal enzima é ativada por quebras de fita simples de DNA e age mutuamente com a PARP1 para facilitar o reparo da excisão de base no DNA (MENISSIER DE MURCIA ET al., 2003). Neste contexto de reparo de quebras de fita simples, PARP2 liga as moléculas de ADP-ribose a polimerase β e XRCC1 a fim de promover o reparo dependente de ligase III. Camundongos com deleção concomitante de PARP1 e PARP2 demonstram uma cinética tardia do SSBR e uma maior sensibilidade à radiação ionizante e reagentes de alquilação (DANTZER et al., 1999; SCHREIBER et al., 2002). Este genótipo também foi demonstrado levar ao desenvolvimento de tumores espontâneos em camundongos com o gene p53 inativado. Este achado sugere uma possível interação funcional entre as proteínas PARP e p53 na supressão do desenvolvimento do tumor por meio da participação de PARP1 e PARP2 tanto na resposta celular às lesões do DNA como na manutenção da integridade genômica (TONG et al., 2001; NICOLÁS et al., 2010).

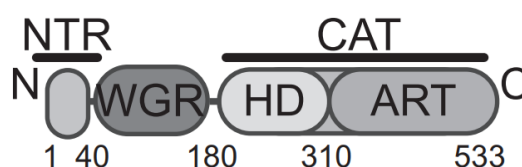
Ademais, dados recentes relataram que a PARP2 desempenha papéis na regulação metabólica, sendo capaz de modificar diversos fatores de transcrição como o fator de transcrição da tireoide-1 (MAEDA et al., 2006) SIRT1 (BAI et al., 2011), e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (BAI et al., 2007).

Na ausência de PARP2, a desregulação da expressão dessas proteínas aumenta a biogênese mitocondrial e o gasto energético, acarretando em alterações metabólicas (BAI et al., 2011).

2.9.3 Poly (ADP-ribose) polimerase III (PARP3)

O gene *PARP3* está localizado no cromossomo 3p21.3. Apesar de PARP3 compartilhar um alto grau de similaridade com o domínio catalítico PARP, domínios de ligação e automodificação de DNA são ausentes (Figura 6) (JOHANSSON et al., 1999).

Figura 6 - Composição dos domínios da proteína PARP3: O domínio CAT (catalítico), compostopor dois subdomínios (HD-subdomínio helicoidal e ART), é responsável pela ligação do NAD⁺ substrato proteico.



Fonte: LANGEЛИER et al, 2014.

Assim como PARP1 e PARP2, a PARP3 também é uma enzima ativa, no entanto, em contraste com aquelas, é apenas capaz de catalisar uma mono-ADP-ribosilação. Anteriormente, foi especulado que a presença ou ausência de um glutamato no domínio catalítico definiria a atividade enzimática de PARPs como uma polimerase ou uma mono-transferase (KLEINE et al., 2008). Contudo, foi demonstrado que a PARP3 possui um glutamato (Glu514) em seu domínio catalítico (LEHTIO et al., 2009), mas, ainda assim, não possui atividade de polimerase, sugerindo que a presença de glutamato no sítio ativo não é a única característica que determina a atividade mono ou poli-ADP-ribosilase. Belousova e colaboradores demonstraram que essa mono-ADP-ribosilação poderia servir como primers para o alongamento adicional do PAR por outras proteínas PARP dependente de dano ao DNA (BELOUSOVA et al., 2018).

A proteína PARP3 é genuinamente expressa em um nível baixo na maioria dos tecidos do macaco cinomolgo (espécie, *Macaca fascicularis*) e sua expressão

é controlada de forma rígida (ROULEAU et al., 2009). Além disso, os níveis de expressão de PARP3 são usualmente maiores em células bem diferenciadas, como os neurônios dos gânglios terminais do que em células imaturas ou proliferativas, como linfócitos maduros ou ovócitos (BELOUSOVA et al., 2018).

Na ausência de dano ao DNA, a atividade enzimática da PARP3 é muito baixa e difícil de discernir acima do background (VYAS et al., 2014). A atividade desta enzima dependente do DNA aparece significativamente maior após a interação com a extremidade 5' fosfato do DNA danificado (LANGEIER et al., 2014). Finalmente, a atividade da PARP3 é estimulada por quebras de dupla fita do DNA *in vitro* (RULTEN et al., 2011).

Na última década, foi relatado que na presença de NAD a proteína é capaz de auto-ADP-ribosilar, bem como a histona H1, um substrato previamente desconhecido da PARP3. Na tentativa de decifrar o envolvimento dos membros da família PARP no reparo do DNA, diversos trabalhos recentes demonstraram que PARP3 desempenha funções no reparo de quebra de dupla fita. Vários estudos revelaram que células humanas desprovidas de PARP3 apresentam uma maior sensibilidade a drogas antitumorais que geram quebra de dupla fita ou um atraso na reparação do dano de quebras de fita dupla do DNA induzido por radiação (BOEHLER et al., 2011; RULTEN et al., 2011). A PARP3 demonstrou ser recrutada para os sítios de dano ao DNA, interagindo com diferentes componentes da via clássica de junção não homóloga, como Ku70, Ku80, DNA-PKcs e DNA ligase IV (ROULEAU et al., 2007; BOEHLER et al., 2011).

A fim de esclarecer a contribuição de PARP3 na manutenção da integridade do genoma, inúmeros mecanismos não mutuamente exclusivos foram apresentados. As ações celulares da PARP3 no NHEJ foram primeiramente relacionadas com o recrutamento da proteína APLF (do inglês, *aprataxin and PNK-like factor*) para o local do dano (RULTEN et al., 2011). Estudos como o de Belousova e colaboradores, demonstraram que PARP3 exibem uma forte ativação preferencial pela extremidade 5' fosfato do DNA quebrado, sendo este também um substrato da DNA ligase IV (Belousova et al., 2018). Evidências, sobretudo fornecidas por Beck e colaboradores, apontaram a atuação de PARP3 em cooperação com o heterodímero Ku70-Ku80 para proteger da

extensa ressecção terminal mediada por Mre11 / CtIP durante a NHEJ, promovendo o reparo através da rota C-NHEJ. De fato, a PARP3 interage e ajuda a recrutar e/ou estabilizar o Ku80 em locais de quebras no DNA para uma ligação eficiente e dependente da Ku. Assim sendo, como observado em células deficientes em Ku80, a depleção de PARP3 leva a um reparo mais lento por NHEJ (BECK et al., 2014).

2.9.4 PARP e câncer

As PARPs são componentes-chave no reparo do DNA, estando envolvidas nas vias da gênese tumoral. Há evidências do aumento da atividade de PARP em certos tipos de tumores humanos, correlacionando-se inversamente com o prognóstico geral dos pacientes (OSSOVSKAYA et al., 2010). Foi demonstrado que o tecido tumoral de pacientes com carcinoma hepatocelular apresentava níveis significativamente elevados de PARP ADPribosilada quando comparado com tecidos próximos não tumorais (NOMURA et al., 2000). Estudos posteriores indicaram que a expressão de PARP1 foi regulada positivamente em uma variedade de tumores com as diferenças mais notáveis observadas em tumores primários da mama, endométrio, pulmão, ovário e pele. Nosho e colaboradores demonstram que a hiperexpressão de RNAm de *PARP1* foi detectada em 64 (70,3%) dos 91 adenoma colorretais estudados (NOSHO et al., 2006).

Com intenção de confirmar estes achados, Ossovskaya e colaboradores investigaram o perfil de expressão do gene *PARP1* em mais de 8.000 tecidos humanos normais e malignos primários. Eles observaram que, apesar da expressão da PARP1 ser relativamente baixa na maioria dos tecidos humanos, ela foi significativamente aumentada em diversas neoplasias primárias, incluindo câncer de ovário, útero, mama, e pulmão, além de linfomas. Em contraste, a elevação dos níveis de expressão de PARP1 foi menos surpreendente nos tumores do cólon e da próstata. A análise da expressão de *PARP2* foi realizada utilizando a mesma população de tumores primários humanos, nos quais foi observada expressão elevada de *PARP1*; no entanto, não revelou diferença significativa entre o tecido tumoral e o normal (OSSOVSKAYA et al., 2010).

Apesar do fato apresentado anteriormente, à medida que se vai descobrindo funções biológicas específicas da PARP2, se torna cada vez mais evidente a sua participação em diversas maneiras no câncer (ALI et al., 2016).

O impacto da PARP3 em tumores humanos é o menos esclarecido das três enzimas. No entanto sua atividade foi descrita como um fator crítico na estabilização do fuso mitótico e na manutenção da integridade dos telômeros, atuando como regulador de NuMA e Tankyrase 1, que são proteínas relacionadas com a organização do fuso mitótico e alongamento de telômeros, respectivamente. Fernández-Marcelo e colaboradores observaram que células de câncer de pulmão, com redução nos níveis PARP3, apresentavam um aumento da atividade da telomerase. Ademais, em células tumorais com baixa atividade da telomerase, a PARP3 era hiperexpressa. Estes achados indicam uma possível correlação inversa entre a atividade da telomerase e a expressão de PARP3 em células tumorais (BOEHLER et al., 2010).

No cenário das leucemias, estudos avaliando a expressão das enzimas PARPs em amostras clínicas são limitados, sendo restritos principalmente à leucemia em adultos (HOLLEMAN et al. 2003). Os trabalhos de KRUK e colaboradores, por exemplo, foi um dos poucos trabalhos a relatar a expressão de PARP em amostras clínicas de LLA infantil (KRUK et al., 2015). Ademais, apesar dos níveis desbalanceados de expressão de *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* terem sido associados ao aumento da incidência de anomalias cromossômicas e a um pior prognóstico em diversos tipos de cânceres humanos, seu impacto na LMA ainda não está completamente esclarecido. Levando em consideração que instabilidade genômica possui um impacto no desenvolvimento de câncer e que, de igual modo, acredita-se que translocações cromossômicas participem do primórdio da doença e possuam notável função no que diz respeito ao prognóstico da LMA, é possível que a expressão aberrante de *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* tenha um impacto sobre integridade cromossômica e isso possa estar associado tanto aos diferentes grupos citogenéticos ao diagnóstico na LMA, quanto ao desfecho clínico dos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os níveis de expressão dos genes *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* nos pacientes com leucemia mieloide aguda *de novo* e sua associação aos achados citogenéticos ao diagnóstico e desfecho clínico dos pacientes.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os níveis de expressão dos genes *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* em pacientes com LMA *de novo*;
- Comparar a expressão relativa dos genes *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* entre os grupos citogenéticos de LMA;
- Determinar o significado prognóstico dos níveis de expressão relativa de *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* para pacientes com LMA *de novo*, utilizando a sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística, tipo e local do estudo

O estudo é do tipo coorte e com comparação de grupos, no qual foram incluídas três coortes independentes. A primeira coorte foi composta por 81 pacientes adultos com LMA de novo, assistidos em hospitais de Recife, Pernambuco, Brasil (coorte Recife). Os pacientes são de ambos os sexos, acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação (HEMOPE), no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), com aprovação pelo Sistema Nacional de Informação sobre Ética envolvendo Seres Humanos (SISNEP-Plataforma Brasil), Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 77527717.4.0000.5208) e os respectivos hospitais.

De forma complementar, foram adicionados a esse estudo a análise de mais duas coortes de bancos de dados independentes. Sendo assim, a segunda coorte (coorte TCGA), deste estudo, inclui 173 pacientes do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), que é composta por dados de pacientes com LMA de novo dos quais as amostras foram coletadas entre novembro de 2001 e março de 2010. A partir desse banco de dado, foi possível a obtenção dos dados clínicos, além dos dados de sequenciamento do exoma e de sequenciamento do genoma completos, refletidos por valores de RPKM (do inglês, *per Million mapped reads*) para representação do nível de expressão normalizado (LEY et al., 2013). Por se tratar de um banco de dados público, esses dados estão disponíveis no website www.cbioportal.org.

A terceira coorte foi composta por 245 pacientes, dos quais os dados clínicos e de expressão podem ser acessados no repositório de expressão gênica do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (GEO-NCBI), sob o registro GSE-6891.

4.2 Análise hematológica e clínica

4.2.1 Coleta de dados e das amostras

A partir das análises dos portuários dos pacientes, foi possível obter as informações referentes a idade, sexo, subtipos de LMA, dados do hemograma, achados citogenéticos e a avaliação do seguimento dos pacientes. Para as amostras, foi dada preferência ao aspirado da medula óssea (MO), contudo nos casos em que não houve MO disponível para as análises, foi utilizada amostra de sangue periférico (SP), desde que este possuísse mais de 80% de blasto.

4.2.2 Critérios de inclusão

- Pacientes maiores de 18 anos cujo diagnóstico de LMA de novo foi baseado na presença de 20% ou mais de mieloblastos nos aspirados de medula óssea ou sangue periférico ou na detecção das alterações citogenéticas t(15;17), t(8;21)(q22;q22) ou inv (16)(p13;q22) tratados e acompanhados no HCP, HEMOPE e IMIP;
- Disponibilidade de DNA e RNA total extraídos a partir de amostras obtidas ao diagnóstico em quantidade e qualidade adequadas para a análise.

4.2.3 Critérios de exclusão

- Pacientes com leucemia mieloide aguda secundária à neoplasia mieloproliferativa/mielodisplásica ou quimio/radioterapia de tumor prévio serão excluídos, assim como os que não apresentarem todos os dados clínico-laboratoriais necessários para este estudo ou por motivo de transferência para outras unidades de saúde que não estejam envolvidas no estudo.

4.3 Análise molecular

4.3.1 Coleta de material

Preferencialmente as amostras foram constituídas de 2 mL do aspirado de MO, em tubos contendo EDTA e, quando não fora possível obter amostras MO, foram coletados 4 mL de SP, em tubos contendo EDTA.

4.3.2 Extração de RNA total

O ácido ribonucleico (RNA) total das amostras de medula óssea e/ou sangue periférico dos pacientes foi extraído utilizando-se a metodologia do reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), a qual se baseia em uma solução monofásica à base de fenol e isotiocianato de guanidina, derivada de uma modificação do método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987).

As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g durante 10 minutos a fim de separar as células do plasma, sendo esse descartado em seguida. O precipitado celular foi transferido para um tubo tipo Falcon de 50 mL, sendo este estéril e livre de RNase, ao qual foram acrescentados 35 mL de Tampão de Lise de Glóbulos Vermelhos, composto de 9 partes de Cloreto de Amônio e 1 parte de Bicarbonato de Amônio, seguindo-se uma incubação em gelo por 20 minutos. O lisado celular foi então centrifugado a 3.000 x g por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante. O precipitado (pellet) de leucócitos foi finalmente ressuspensionado em 1 mL de Salina Tamponada com Fosfato (Phosphate Buffer Saline - PBS) [1x]. Uma vez feito isso, foram feitas alíquotas em tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL, livres de RNase, a partir dessa ressuspensão, aos quais foi adicionado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), numa proporção de 3 partes de Trizol para 1 parte de células. Com o auxílio de pipeta foi feita a homogeneização da amostra, durante a qual o Trizol leva a lise dos leucócitos, assim como, dissolve os componentes celulares, ao mesmo tempo mantém a integridade do RNA. Depois de um período de incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, 200 µl de clorofórmio foram acrescentados (MERCK, EUA) aos tubos, seguindo-se agitação intensa em vortex por 15 segundos, incubação por 20 minutos à temperatura

ambiente e centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 15 minutos. A adição do clorofórmio, seguida de centrifugação, promove a separação da solução em uma fase orgânica e outra aquosa, sendo esta última a fase na qual o RNA Total permanece exclusivamente. A fase aquosa foi transferida para tubos novos de 1.5 mL livres de RNase e o RNA Total foi precipitado com 500 µl de Álcool Isopropílico. Após centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1 mL de Etanol 75% e centrifugado a 10.000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o pellet posto para secar à temperatura ambiente. Por último, foi utilizada água destilada e deionizada, tratada com o inibidor de RNase Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (SIGMA, EUA) para ressuspender o pellet e, então, foi conservado em freezer -80°C até o momento do uso.

4.3.3 Quantificação de ácidos nucleicos

Para a quantificação de ácidos nucleicos extraída, alíquotas de 2 µl de cada amostra foram submetidas à leitura da densidade ótica a 260 nm (DO260) pelo espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Inglaterra). Partindo do princípio que a leitura a 280 nm (DO280) permite estimar a contaminação com proteínas, a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nanômetros (A260/A280) foi considerada como um indicativo de pureza das amostras. Foram utilizadas preparações apresentando razão A260/A280 entre 1.7 e 2.0.

4.3.4 Síntese da primeira fita de DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA), a partir do RNA total, foi realizada com a utilização do kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, EUA). As reações ocorreram em volumes de 25 µl, contendo um micrograma de RNA Total, 2.5 µl de 10x RT Buffer, 1 µl de 25x dNTP mixture, 2.5 µl 10x Random Primers, 1.25 µl de MultiScribe RT (50U/µl), 0.65 µl de RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega, EUA) e água deionizada tratada com DEPC 0,1% (SIGMA, EUA) no volume suficiente para completar o volume final. As reações sucederam por 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 segundos a 85°C.

4.3.5 Desenhos dos primers para qRT-PCR

Os primers foram desenhados com auxílio do programa Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), observando-se certos parâmetros, tais como: temperatura de anelamento, tamanho dos primers, tamanho do amplicon, porcentagem de GC, ausência da formação de dímeros e a inexistência de sítios secundários de anelamento. Os primers desenhados (Tabela 1) foram sintetizados pela Biogem da Invitrogen™.

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados nas reações para as análises de expressão gênica.

Primers	Sequência dos Primers		Amplicom (pb)
PARP1	Fw	5'TAGCTGATGGCATGGTGTTC3'	98
	Rv	5'GACGTCCCCAGTGCAGTAAT3'	
PARP2	Fw	5'TTTTCTCTCTCTCCCTTTCTAGG	70
	Rv	5'TTTAGCATGACATCATAGACATCATT3'	
PARP3	Fw	5'CATCATGCCACATTCTGGTG3'	72
	Rv	5'CCAGCTGACTTGCTGTTCTCT3'	

Fonte: O autor (2022).

4.3.6 Validações dos primers

Pretendendo avaliar a eficiência de cada par de primer, uma amostra padrão foi submetida, a princípio, à PCR para amplificação dos fragmentos em questão. As reações ocorreram de acordo com o informado na Tabela 2. A princípio as amostras foram submetidas a uma desnaturação a 95°C por 1 minutos, seguindo-se 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; concluindo em uma extensão a 72°C por 1 minuto. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e luz UV no aparelho ImageQuant™ TL (GE Healthcare, USA).

Tabela 2 - Composição da reação para amplificação dos fragmentos na PCR convencional.

Componentes	Volumes
	(µl)
Tampão (10x)	2,5
MgCl ₂ (50mM)	1

dNTP's (10mM)	1
Primer Sense (10 mM)	1
Primer Antisense (10 mM)	1
Taq DNA Polimerase (5)	0,2
DNA (200 ng)	2
dH ₂ O	16,3
Volume Final (ml)	25

Fonte: O autor (2022).

O procedimento da validação experimental foi realizado utilizando os amplificados supracitados, em 7 diluições seriadas, sendo a primeira de 1000x (isto é, 1 µl de produto de PCR em 999 µl de água) e as demais diluições de 10x, a fim de se obter padrões específicos. As reações foram realizadas no termociclador QuantStudio™ 5, utilizando a metodologia SYBR Green, conforme recomendação do fabricante, no volume de 25 µl, contendo: 5 µl de PCR Master mix, 0,2 µl de cada primer e 3,6 µl de água destilada. A validação foi feita com 40 ciclos descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Ciclos da validação dos primers na RT-qPCR.

Estágios	Temperatura(°C)	Tempo
Holding Stage	50	2 minutos
Holding Stage	95	10 minutos
Cycling Stage	95	15 segundos
Cycling Stage	60	1 minuto
Melt Curve Stage	95	15 segundos
Melt Curve Stage	60	1 minuto
Melt Curve Stage	95	1 segundo

Fonte: O autor (2022).

Foram utilizados os genes endógenos Gmβ-Actina e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) como controle da reação (tabela 4) e, para verificação interna da reação, um controle negativo não contendo cDNA.

Tabela 4- Sequência dos primers dos genes endógenos utilizados nas reações para as análises de expressão gênica.

Primers	Sequência dos Primers	Amplicon (pb)
ACTB	Fw 5' AGGCCAACCGCAAGAAG 3'	79
ACTB	Rv 5' ACAGCCTGGATAGCAACGTACA 3'	
HPRT	Fw 5' GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA 3'	101
HPRT	Rv 5' GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA 3'	

Fonte: O autor (2022).

4.3.7 Cálculo da eficiência de amplificação (E)

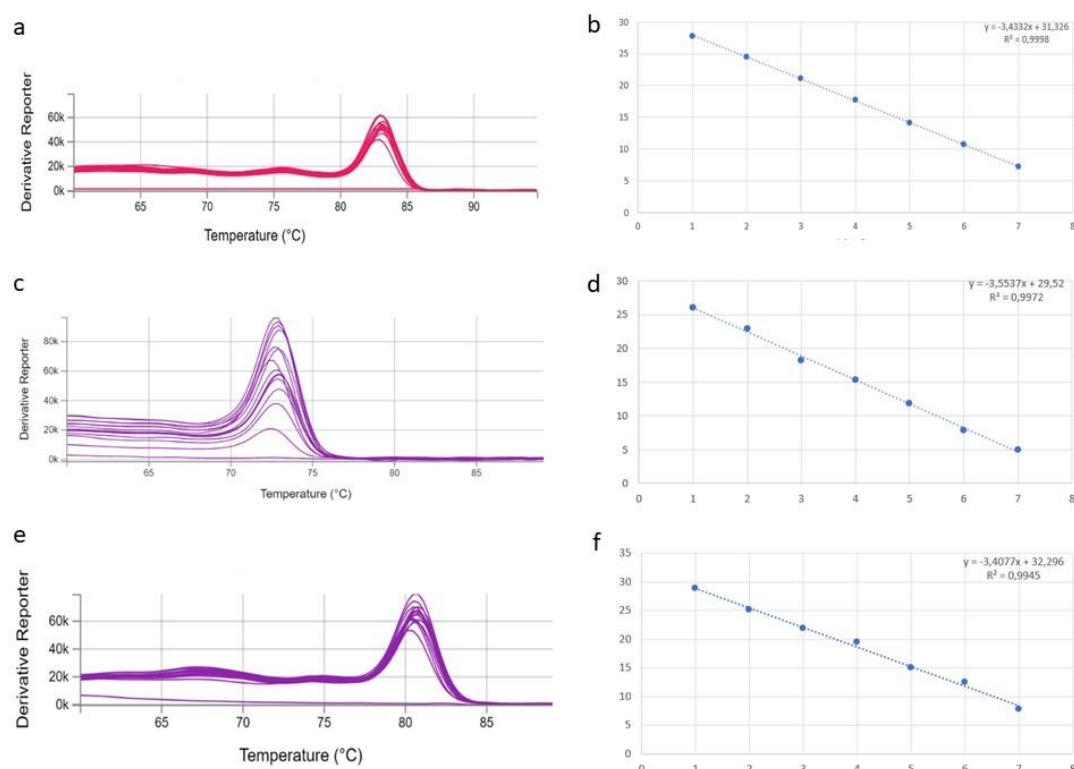
A partir dos valores de Ct das amostras (isto é, números de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência seja superior à fluorescência inespecífica emitida) (Figura7- a, c, e) foi gerada uma curva padrão representada por um gráfico de regressão linear (Figura 7- b, d, f). Sendo utilizada a inclinação da curva (slope) para a análise da amplificação da reação de qRT-PCR.

As análises de eficiência dos pares de primers para qRT-PCR foram realizadas através da fórmula algorítmica de ZHAO e FERNALD (2005), conforme segue:

$$\text{Eficiência da amplificação } E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

Para serem eficientes, é necessária uma eficiência próxima a 100% (tabela 5).

Figura 7 - Ensaios de eficiência dos primers. **(a, b)** – PARP1; gráfico de temperatura de melting e gráfico de regressão linear, respectivamente. **(c, d)** – PARP2; gráfico de temperatura de melting e gráfico de regressão linear, respectivamente. **(e, f)** – PARP3; gráfico de temperatura de melting e gráfico de regressão linear, respectivamente.



Fonte: O autor (2022).

Tabela 5 - Os valores de eficiência apresentados pelos primers do proposto estudo.

Gene	Slope	R ²	Eficiência dos primers (%)
PARP1	-3,4332	0,9998	95,5
PARP2	-3,5537	0,9972	91,2
PARP3	-3,4077	0,9945	99,7

Fonte: O autor (2022).

4.4 Análise de expressão gênica

A avaliação dos níveis de expressão genes *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* foi feita por qRT-PCR, utilizando-se *primers* e a metodologia *SYBR Green*. Neste método, a intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto amplificado. Uma vez que o sinal é gerado quando o reagente se liga ao DNA de

dupla fita, inclusive para produtos indesejáveis, a diferenciação entre os sinais é feita a partir da análise de curva de dissociação, também chamada curva de melting. Os genes foram amplificados de forma separada. A amplificação foi realizada em duplicata, em placas óticas de 96 poços, com reações realizadas usando as mesmas proporções e ciclos do teste de eficiência, assim como, no equipamento QuantStudio™ 5.

Para determinar os níveis relativos de expressão, utilizou-se o método *Comparative Cycle Threshold* (Ct). Para este método, a relação da expressão relativa (R) do gene alvo foi calculada com base na eficiência da amplificação (E), tal como a média entre os ciclos das replicatas onde foi identificado o sinal fluorescente acima do sinal basal (Ct) (PFAFFL, 2004), conforme segue:

$$\text{Expressão relativa (R)} = \frac{E_{\text{gene alvo}} \Delta (\text{Ct}_{\text{gene alvo}} - \text{Ct}_{\text{gene endógeno}})}{E_{\text{gene controle}} \Delta (\text{Ct}_{\text{gene alvo}} - \text{Ct}_{\text{gene endógeno}})}$$

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS Statistics 25.0, MedCalc statistical software, JASP 0.14.0.0 e GraphPad Prism 8. A princípio foi realizado o teste de shapiro-wilk, a fim de analisar se as variáveis contínuas apresentavam distribuição normal (DN). A estratificação dos pacientes foi feita a partir da curva ROC. Para as variáveis com DN, a comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste T não pareado. O teste KruskalWallis foi realizado com grupos que não possuíam distribuição normal. O teste χ^2 ou o teste exato de Fisher foram utilizados almejando comparar variáveis categóricas. A partir do método de Kaplan-Meier foram calculadas as estimativas, a média e a mediana para sobrevida global e sobrevida livre de doença dos respectivos pacientes e o teste de log-rank para comparar as curvas de sobrevida. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados como significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes

As características clínico-laboratoriais das coortes Recife, TCGA e GSE estão apresentadas na Tabela 6. A coorte Recife foi constituída de 81 pacientes com LMA *de novo*, estando incluído na mesma 38 (47%) pacientes do sexo feminino e a média de idade de 50 anos, variando entre 18 a 94 anos. A coorte TCGA foi constituída de 173 pacientes com LMA de novo, dos quais 81 (47%) foram do sexo feminino e a média de idade foi de 55 anos, com variação de 18 a 88 anos. A coorte GSE6891, por sua vez, é constituída por 245 pacientes, sendo 126 (51%) do sexo feminino e 119 (49%) do sexo masculino, variando de 18 a 60 anos.

Faz necessário salientar que 46 dos pacientes da coorte Recife não possuíam dados da análise citogenética devido à falta de solicitação médica ou mesmo por possuírem resultados inconclusivos. Todavia, dos 35 pacientes que apresentaram análise citogenética, 17 (49%) apresentaram cariótipo normal, 5 (14%) com cariótipo complexo, 8 (23%) eram CBF-AML (do inglês, *Core-binding factor acute myeloid leucemia*), isto é, apresentaram t(8;21)(q22;q22) ou inv (16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1q22).

Tabela 6 - Características clínico-laboratoriais dos pacientes das coortes Recife, TCGA e GSE

	Coorte Recife (n= 81)	Coorte TCGA (n= 173)	Coorte GSE (n= 245)
Sexo			
Masculino	43 (53%)	92 (53%)	119 (49%)
Feminino	38 (47%)	81 (47%)	126 (51%)
Idade (média, anos)	50	55	41
Blastos MO (%)	65,7	69,09	-
Subtipo FAB			
M0	5 (6%)	16 (9%)	6 (3%)
M1	12 (15%)	44 (26%)	54 (23%)
M2	30 (38%)	38 (22%)	52 (22%)
M3	0 (0%)	16 (9%)	18 (8%)
M4	23 (29%)	34 (20%)	40 (17%)
M5	8 (10%)	18 (11%)	62 (26%)
M6	0 (0%)	2 (1%)	3 (1%)
M7	0 (0%)	3 (2%)	0 (0%)
Risco citogenético/molecular			
Favorável	11 (30%)	32 (19%)	58 (24%)
Intermediário	20 (54%)	101 (59%)	146 (61%)
Desfavorável	6 (16%)	37 (22%)	35 (15%)
Citogenética			
CN	17 (49%)	80 (46%)	102 (42%)
CC	5 (14%)	22 (13%)	8 (3%)
t(8;21)/t(16;16)/inv(16)	8 (23%)	17 (10%)	41 (17%)
t(15;17)	0 (0%)	15 (9%)	18 (7%)
Outros	5 (14%)	39 (23%)	76 (31%)

Fonte: O autor (2022).

5.2 PARP1

5.2.1 Coorte Recife

Apesar de não haver, significativamente, diferença estatística entre os grupos, é notável o aumento da expressão de *PARP1* nos pacientes com cariótipo complexo, assim como, nos pacientes classificados com risco desfavorável (figura 8 -b, a).

5.2.2 Coorte TCGA

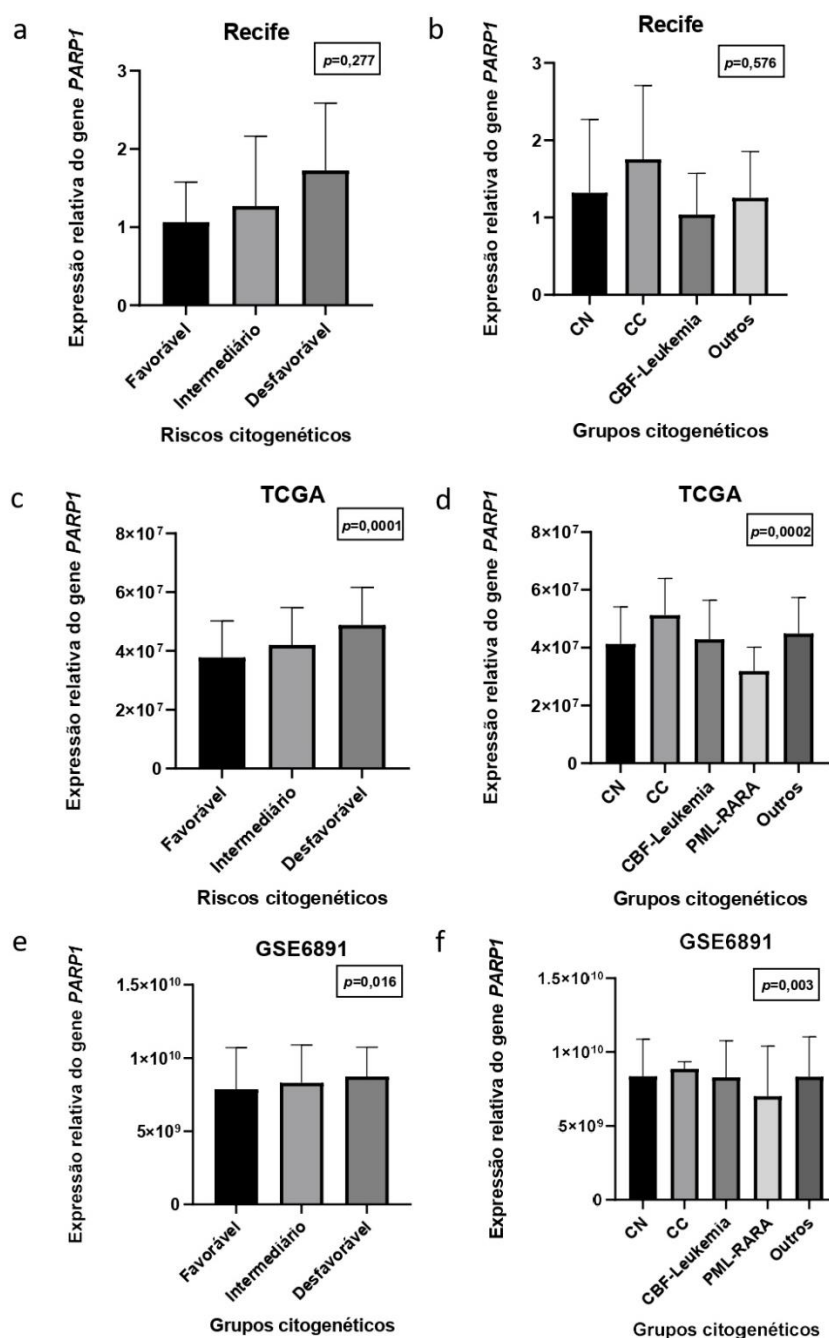
O nível de expressão do gene *PARP1* demonstrou variação entre os diferentes grupos referentes à classificação FAB nesta coorte ($p=0,000$), diferentemente do que foi observado na coorte Recife (tabela 6).

Como observado na figura 8 – d, c, existe uma diferença significativa de níveis de expressão de *PARP1* tanto entre os diferentes grupos citogenéticos, quanto aos grupos da estratificação de risco proposta pelo grupo ELN ($p= 0,00$ e $p=0,00$). 51% dos pacientes pertencentes ao risco desfavorável apresentaram níveis elevados de *PAR1*, bem como 55% dos pacientes com cariótipo complexo (tabela 7).

5.2.3 Coorte GSE

Indo de encontro ao encontrado na coorte do TCGA, não houve uma variação significativa na expressão do gene *PARP1* entre os diferentes grupos referentes à classificação FAB ($p=0,245$) (tabela 7). Da mesma forma, não foi observada diferença entre os grupos citogenéticos ou mesmo os grupos de estratificação de risco ($p= 0,083$ e $p=0,321$, respectivamente) (Tabela 7).

Figura 8 - Expressão relativa de *PARP1* entre as categorias de risco citogenéticos e os principais grupos citogenéticos ao diagnóstico. **(a, b)** - Níveis de expressão do gene *PARP1* de acordo com as categorias de risco citogenético do grupo Medical Research Council e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte de Recife; **(b, c)** - Níveis de expressão do gene *PARP2* de acordo com as categorias de risco citogenético propostas pelo grupo European Leukemia Net e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte do TCGA; **(d, e)** - Níveis de expressão do gene *PARP1* de acordo com as categorias de risco citogenético e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte do GSE; CC: cariótipo complexo; CN: cariótipo normal.



Fonte: O autor (2022).

Tabela 7 - Expressão do *PARP1* e sua relação com variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com LMA nas três coortes; CC: cariótipo complexo/ CN: cariótipo normal; a. Teste exato de Fisher/ b. Teste qui-quadrado.

	Coorte Recife			Coorte TCGA			Coorte GSE		
	Baixa expressão	PARP1 Alta expressão	Valor <i>p</i>	Baixa expressão	PARP1 Alta expressão	Valor <i>p</i>	Baixa expressão	PARP1 Alta expressão	Valor <i>p</i>
Sexo			0,539a			0,303a			0,620a
Masculino	16 (41%)	23 (59%)		65 (71%)	27 (29%)		96 (81%)	23 (19%)	
Feminino	12 (43%)	16 (57%)		63 (78%)	18 (22%)		105 (83%)	21 (17%)	
Subtipo FAB			0,355b	127	44	0,000b			0,245b
M0	0 (0%)	5 (100%)		11 (69%)	5 (31%)		5 (83%)	1 (17%)	
M1	3 (33%)	6 (67%)		26 (59%)	18 (41%)		39 (72%)	15 (28%)	
M2	12 (46%)	14 (54%)		24 (63%)	14 (37%)		42 (80%)	10 (20%)	
M3	0 (0%)	0 (0%)		16 (100%)	0 (0%)		17 (94%)	1 (6%)	
M4	7 (41%)	10 (59%)		33 (97%)	1 (3%)		37 (92%)	3 (8%)	
M5	5 (63%)	3 (37%)		16 (89%)	2 (11%)		50 (81%)	12 (19%)	
M6	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	2 (100%)		2 (67%)	1 (33%)	
M7	0 (0%)	0 (0%)		1 (33%)	2 (67%)		1 (100%)	0 (0%)	
Citogenética			0,865b			0,014b			0,321b
CN	5 (36%)	9 (64%)		62 (78%)	18 (22%)		74 (72%)	28 (28%)	
CC	1 (20%)	4 (80%)		10 (45%)	12 (55%)		5 (71%)	2 (29%)	
CBF-leukemia	3 (43%)	4 (57%)		12 (71%)	5 (29%)		17 (94%)	1 (6%)	
PML-RARA	0 (0%)	0 (0%)		15 (100%)	0 (0%)		34 (83%)	7 (17%)	
Outros	2 (40%)	3 (60%)		28 (72%)	11 (28%)		51 (67%)	25 (33%)	
Risco citogenético/molecular			0,498b			0,008b			0,083b
Favorável	4 (44%)	5 (56%)		27 (84%)	5 (16%)		50 (86%)	8 (14%)	
Intermediário	7 (41%)	10 (59%)		78 (77%)	23 (23%)		107 (73%)	39 (27%)	
Desfavorável	1 (17%)	5 (83%)		19 (49%)	20 (51%)		23 (66%)	12 (34%)	

Fonte: O autor (2022).

5.2.4 Impacto da expressão de *PARP1* no desfecho clínico dos pacientes LMA

5.2.4.1 Coorte Recife

Com o intuito de comparar as taxas de sobrevida entre os grupos com baixa e alta expressão do gene *PARP1*, os valores contínuos foram dicotomizados utilizando-se a curva ROC, que leva em consideração a relação entre sensibilidade e especificidade do teste. A média de tempo de sobrevida foi de 17,99 meses (IC95%: 9,01-26,97). Como exposto na Fig. 9 - a, na qual pacientes com maiores níveis de expressão apresentaram sobrevida de 15,65 meses, comparados a 18,18 meses dos pacientes com baixa expressão, não houve diferença significativa entre ambos os grupos ($p=0,313$). Igualmente, não houve diferença no que diz respeito à sobrevida livre de doença ($p=0,938$) (Figura 9 - b).

5.2.4.2 Coorte TCGA

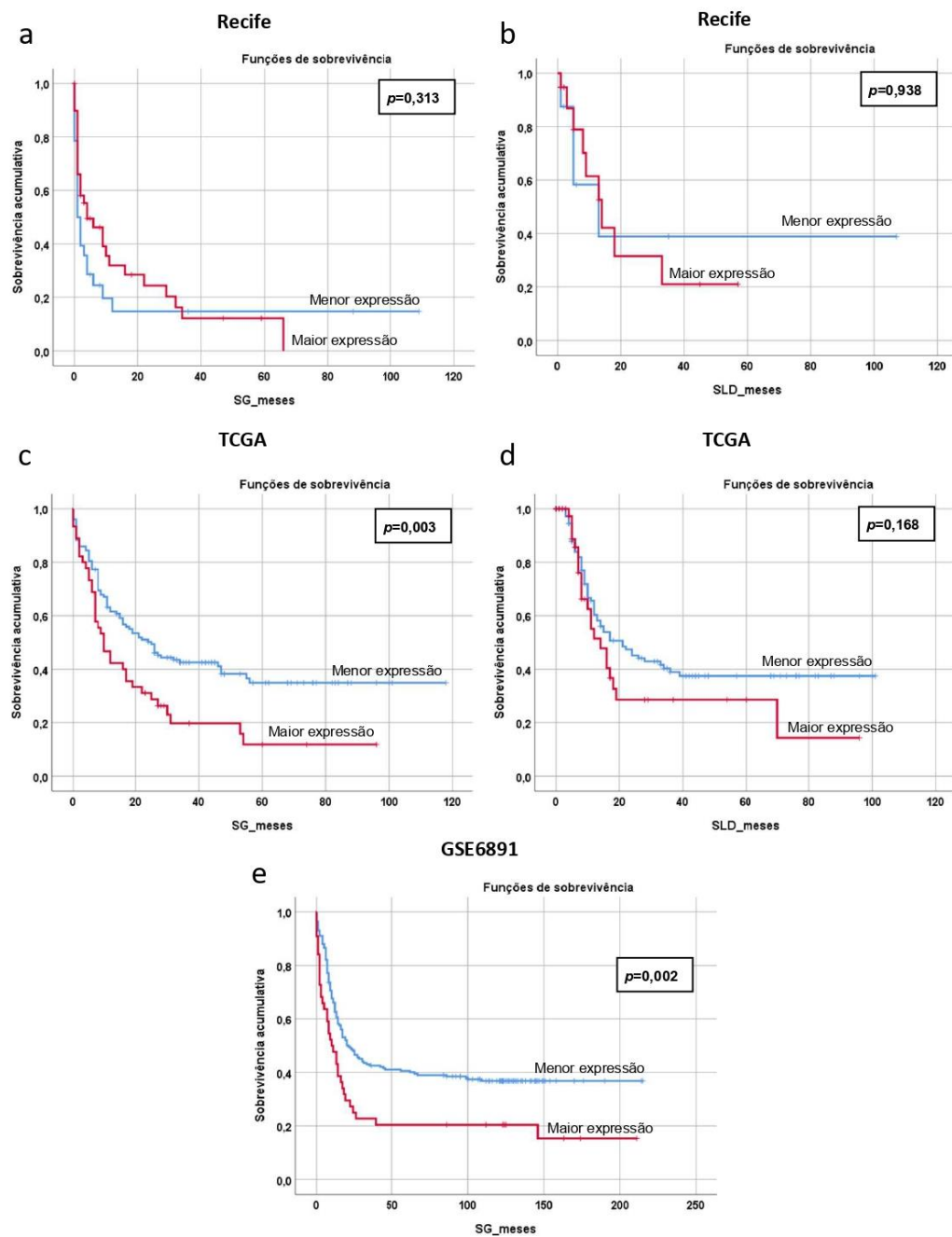
Com média de tempo de sobrevida de 44,9 meses (IC95%: 37,2-52,6), os pacientes do grupo de alta expressão, da coorte do TCGA, apresentaram diminuição expressiva do tempo de sobrevida (24,05 meses) comparados com o grupo de baixa expressão (51,30 meses) ($p=0,003$) (Figura 9 - c). E, apesar de aqueles pacientes também terem demonstrado uma diminuição na SLD (31,352 meses vs 46,12 meses dos pacientes com baixos níveis de expressão), tal diferença não se demonstrou ser significativa ($p=0,168$) (Figura 9 - d).

5.2.4.3 Coorte GSE

A média de tempo de sobrevida global da coorte do GSE foi de 81,4 meses (IC95%: 69,3-93,5). Assim como observado na coorte anterior, pacientes do grupo de alta expressão apresentaram uma diminuição considerável na sobrevida global, isto é, 47,18 meses, em comparação com o grupo de baixa expressão que apresentou 89,65 meses ($p=0,002$) (Fig. 9 - e).

Não foi realizada a análise de SLD da mesma, devido à ausência de dados suficientes para tal.

Figura 9 - Análise de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença dos pacientes (SLD) das coortes de Recife (a, b); TCGA (c, d); GSE (e), referentes a expressão do gene *PARP1*.



Fonte: O autor (2022).

5.3 PARP2

5.3.1 Coorte Recife

Como observado na Figura 10a, apesar da expressão de *PARP2*, aparentemente, ser maior nos pacientes com cariótipo complexo, não demonstrou variar de forma significativa entre os grupos, igualmente, não houve variação entre os grupos de risco citogenéticos (respectivamente, $p=0,218$ e $p=0,354$).

Diferentemente daquele, os níveis de expressão variaram entre os diferentes grupos de classificação FAB ($p=0,017$) (Tabela 8).

5.3.2 Coorte TCGA

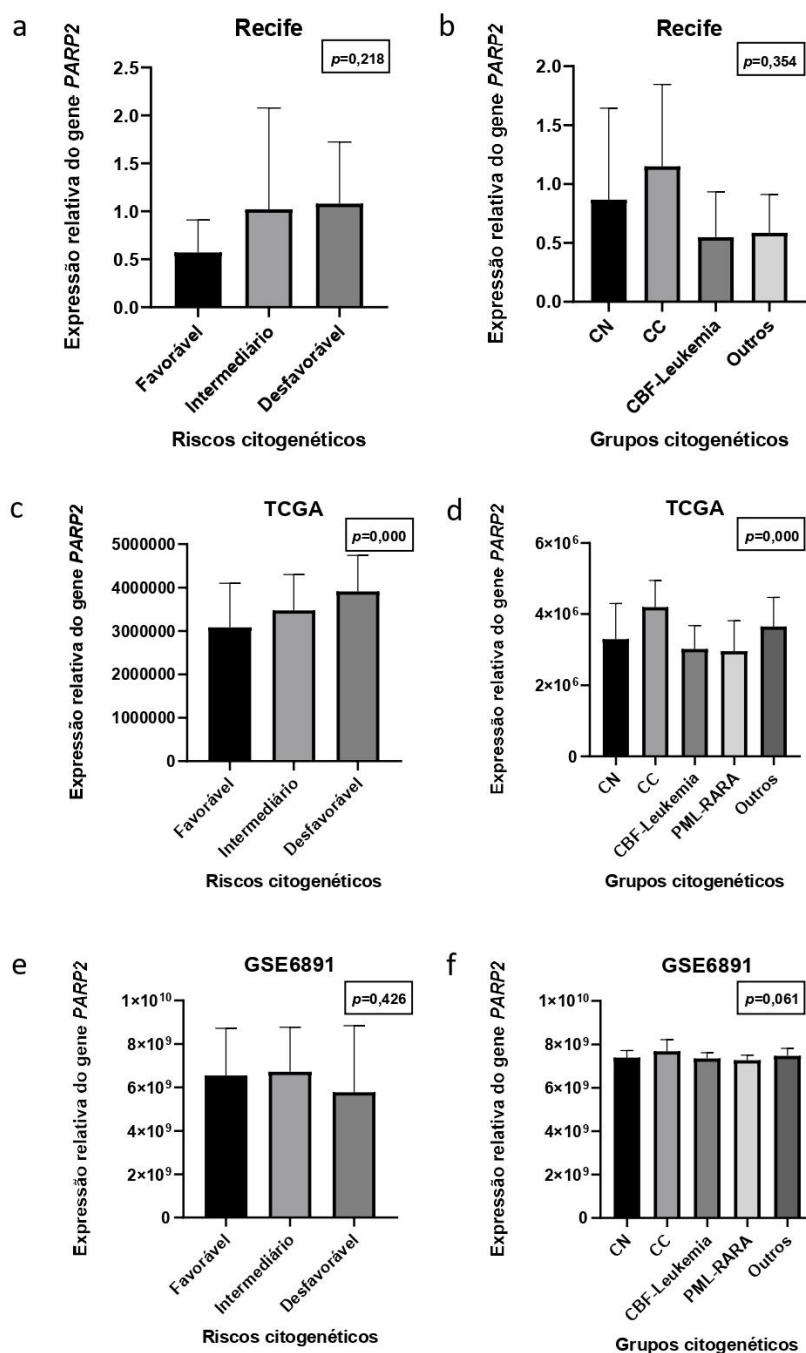
O grau de expressão do gene *PARP2* variou entre os diferentes grupos referentes à classificação FAB nesta coorte ($p=0,000$), igual como fora observado na coorte Recife (tabela 8).

Tantos os diferentes grupos citogenéticos ao diagnóstico, quanto os grupos de estratificação de risco proposta pelo grupo ELN, apresentaram diferença significativa entre os níveis de expressão ($p=0,000$ e $p=0,000$) (Figura 10 – a, b). É interessante ressaltar que 100% dos pacientes com cariótipo complexo apresentaram alto nível de expressão de *PARP2*, assim como 86% dos pacientes estratificados no grupo de risco desfavorável também apresentaram maiores níveis de expressão (tabela 8).

5.3.3 Coorte GSE

Assim como a coorte do TCGA, houve uma variação significativa na expressão do gene *PARP2* entre os diferentes grupos referentes à classificação FAB ($p=0,02$) (tabela 8). Todavia, diferentemente daquela, não houve diferença no que diz respeito aos diferentes grupos citogenéticos ou mesmo os grupos de estratificação de risco ($p=0,401$ e $p=0,702$, respectivamente) (Tabela 8).

Figura 10 - Expressão relativa de *PARP2* entre as categorias de risco citogenéticos e os principais grupos citogenéticos ao diagnóstico. **(a, b)** - Níveis de expressão do gene *PARP2* de acordo com as categorias de risco citogenético do grupo *Medical Research Council* e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte de Recife; **(b, c)** - Níveis de expressão do gene *PARP2* de acordo com as categorias de risco citogenético propostas pelo grupo *European Leukemia Net* e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte do TCGA; **(d, e)** - Níveis de expressão do gene *PARP2* de acordo com as categorias de risco citogenético e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte do GSE; CC: cariótipo complexo; CN: cariótipo normal.



Fonte: O autor (2022).

Tabela 8 - Expressão do *PARP2* e sua relação com variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com LMA nas três coortes; CC: cariótipo complexo/ CN: cariótipo normal; a. Teste exato de Fisher/ b. Teste qui-quadrado.

	Coorte Recife			Coorte TCGA			Coorte GSE		
	<i>PARP2</i>		Valor <i>p</i>	<i>PARP2</i>		Valor <i>p</i>	<i>PARP2</i>		Valor <i>p</i>
	Baixa expressão	Alta expressão		Baixa expressão	Alta expressão		Baixa expressão	Alta expressão	
Sexo			0,263a			0,263a			0,443a
Masculino	28 (30%)	64 (70%)		28 (30%)	64 (70%)		64 (54%)	55 (46%)	
Feminino	32 (40%)	49 (60%)		32 (40%)	49 (60%)		74 (59%)	52 (41%)	
Subtipo FAB			0,017b			0,000b	133	103	0,02b
M0	1 (20%)	4 (80%)		5 (31%)	11 (69%)		3 (50%)	3 (50%)	
M1	5 (42%)	7 (58%)		6 (14%)	38 (86%)		22 (41%)	32 (59%)	
M2	17 (57%)	13 (43%)		7 (18%)	31 (82%)		25 (48%)	27 (52%)	
M3	0 (0%)	0 (0%)		10 (63%)	6 (38%)		13 (72%)	5 (28%)	
M4	13 (59%)	9 (41%)		19 (56%)	15 (44%)		25 (63%)	15 (37%)	
M5	8 (100%)	0 (0%)		13 (72%)	5 (28%)		44 (71%)	18 (29%)	
M6	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	2 (100%)		1 (33%)	2 (67%)	
M7	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	3 (100%)		0 (0%)	1 (100%)	
Citogenética			0,644b			0,000b			0,401b
CN	11 (65%)	6 (45%)		28 (36%)	50 (64%)		60 (59%)	42 (41%)	
CC	2 (40%)	3 (60%)		0 (0%)	20 (100%)		3 (38%)	5 (62%)	
CBF-leukemia	6 (75%)	2 (25%)		10 (59%)	7 (41%)		23 (56%)	18 (44%)	
PML-RARA	0 (0%)	0 (0%)		10 (71%)	4 (29%)		13 (72%)	5 (28%)	
Outros	3 (60%)	2 (40%)		9 (24%)	29 (76%)		39 (51%)	37 (49%)	
Risco citogenético			0,415b			0,000b			0,702b
Favorável	8 (80%)	2 (20%)		20 (63%)	12 (37%)		35 (60%)	23 (40%)	
Intermediário	12 (60%)	8 (40%)		35 (35%)	66 (65%)		83 (57%)	63 (43%)	
Desfavorável	2 (40%)	3 (60%)		5 (14%)	32 (86%)		18 (51%)	17 (49%)	

Fonte: O autor (2022).

5.3.4 Impacto da expressão de *PARP2* no desfecho clínico dos pacientes LMA

5.3.4.1 Coorte Recife

A média de tempo de sobrevida foi de 18,76 meses (IC95%: 10,52-26,99). Como exposto na Figura 11 - a, não houve diferença no tempo de sobrevida entre os grupos de baixo e alta expressão ($p=0,753$). Semelhantemente, não houve diferença no que diz respeito à sobrevida livre de doença ($p=0,694$) (Fig. 11b).

5.3.4.2 Coorte TCGA

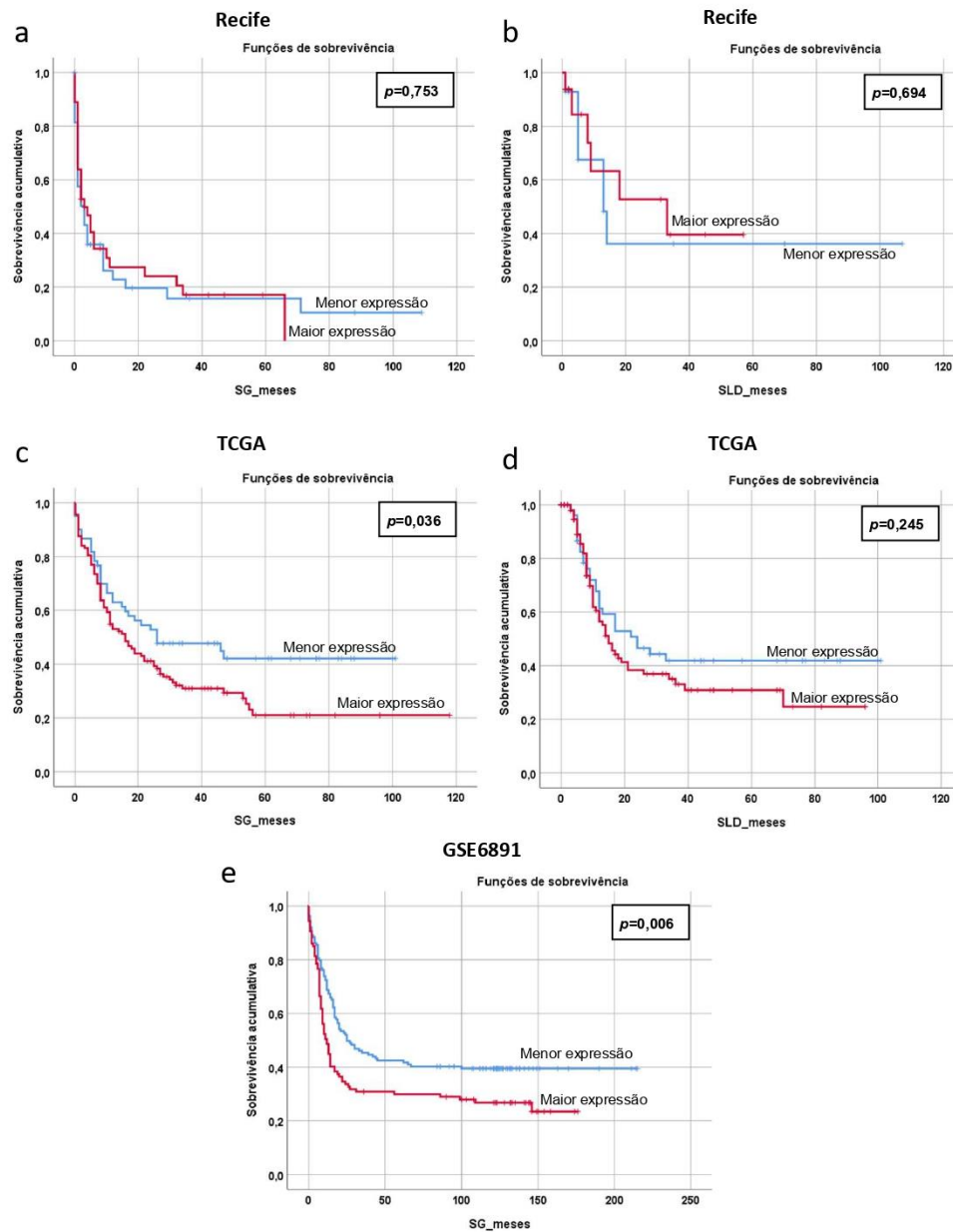
A média de tempo de sobrevida dessa coorte foi de 44,9 meses (IC95%: 37,2-52,6). Como observa-se na Figura 11 - c, pacientes pertencentes ao grupo de alta expressão (30,3 meses) apresentaram diminuição do tempo de sobrevida comparados com o grupo de baixa expressão (64,7 meses) ($p=0,036$). Da mesma forma, foi observada uma diminuição da sobrevida livre de doença (SLD) dos pacientes com maiores níveis de expressão (37 meses vs 49,5 meses), embora não observada diferença estatística entre os grupos ($p=0,245$) (Figura 11 -d).

5.3.4.3 Coorte GSE

A média de tempo de sobrevida global da coorte do GSE foi de 81,4 meses (IC95%: 69,3-93,5). Assim como as demais coortes, a dicotomização dos valores contínuos foi realizada a partir da curva ROC. Da mesma forma que foi observado na coorte do TCGA, pacientes do grupo de alta expressão apresentaram uma diminuição significativa na sobrevida, isto é, 55,9 meses, quando comparados ao grupo de baixa expressão que apresentou 94,8 meses ($p=0,006$) (Figura 11).

Não foi realizada a análise de SLD da mesma, por ausência de dados suficientes para isso.

Figura 11 - Análise de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) dos pacientes das coortes de Recife (a, b); TCGA (c, d); GSE (e) referentes ao gene *PARP2*.



Fonte: O autor (2022).

5.4 PARP3

5.4.1 Coorte Recife

Os pacientes classificados com risco intermediário, assim como com cariótipo normal, apresentaram maiores níveis de expressão de *PARP3*, apesar de não demonstrar variação significativa entre os grupos (Fig. 12 – a, b) (respectivamente, $p=0,290$ e $p=0,521$).

5.4.2 Coorte TCGA

Nesta coorte foi observado uma variação significativa no que diz respeito aos diferentes grupos citogenéticos ao diagnóstico ($p=0,000$) (Figura 12 – c, d), todavia, diferentemente do gene *PARP2*, este apresentou aumento do nível de expressão entre os pacientes com cariótipo normal, isto é, a maior parte dos mesmos, cerca de 74% tiveram maior nível de expressão (Tabela 9). Outro ponto importante a se observar é o fato de que todos os pacientes com t(15;17) (PML-RAR) apresentaram baixos níveis de expressão (Tabela 9).

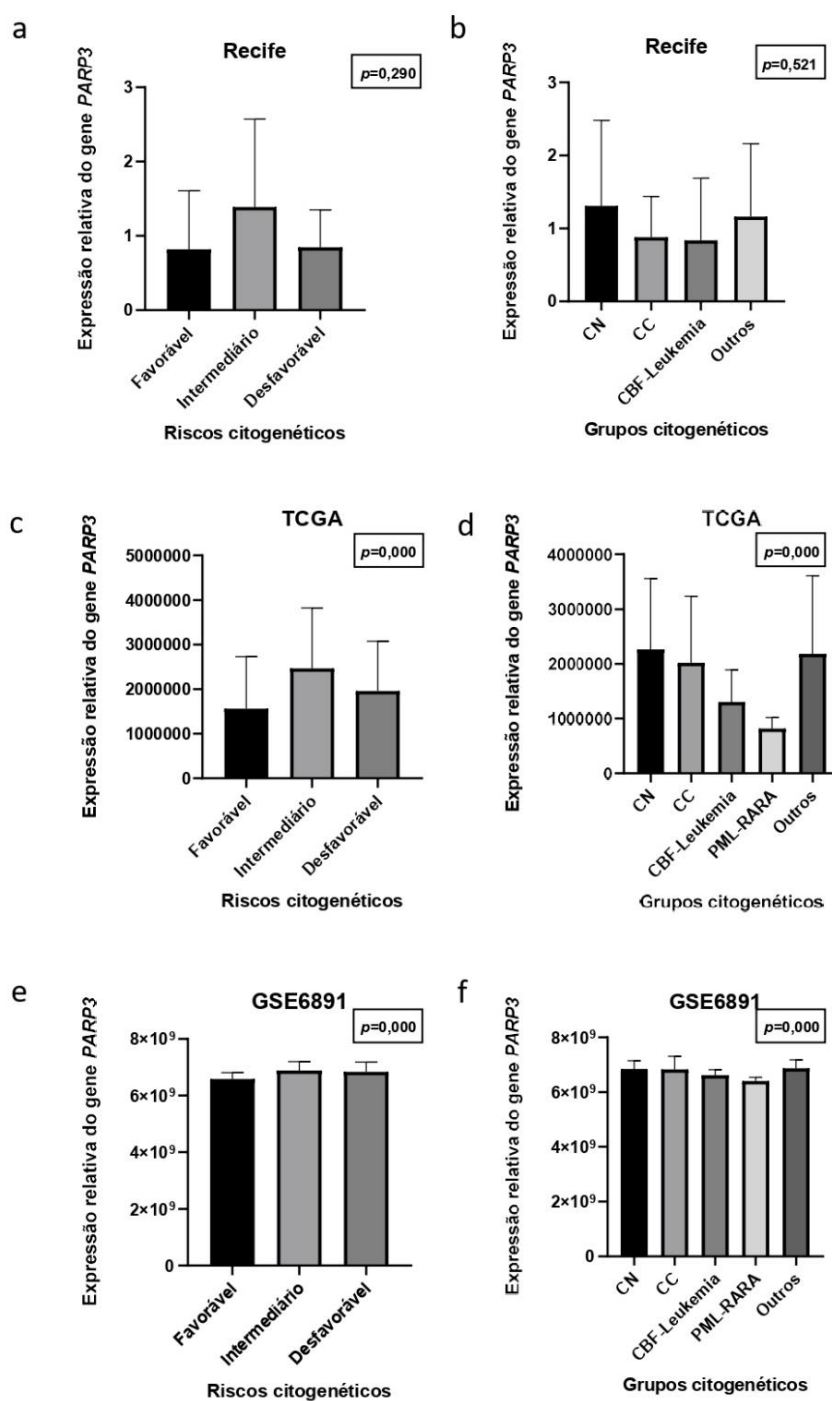
Da mesma forma, pacientes agrupados no grupo de risco intermediário apresentaram maiores níveis de expressão (Figura 12 - c, Tabela 9), corroborando com o achado informado acima.

Referente à classificação FAB, assim como demonstrado para o gene *PARP2*, o grau de expressão de *PARP3* demonstrou variar entre os diferentes grupos nesta coorte ($p=0,000$) (Tabela 9).

5.4.3 Coorte GSE

Como observado nas demais coortes, pacientes com risco intermediário e cariótipo normal apresentaram maiores níveis de expressão (tabela 9). No qual, tais níveis demonstram-se variar entre os grupos de classificação de ($p=<0,001$ e $p=<0,001$, respectivamente) (Fig. 12 – d, e).

Figura 12 - Expressão relativa de *PARP3* entre as categorias de risco citogenéticos e os principais grupos citogenéticos ao diagnóstico. **(a, b)** - Níveis de expressão do gene *PARP3* de acordo com as categorias de risco citogenético do grupo *Medical Research Council* e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte de Recife; **(b, c)** - Níveis de expressão do gene *PARP3* de acordo com as categorias de risco citogenético propostas pelo grupo *European Leukemia Net* e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte do TCGA; **(d, e)** - Níveis de expressão do gene *PARP3* de acordo com as categorias de risco citogenético e principais grupos citogenéticos ao diagnóstico, respectivamente, na coorte do GSE; CC: cariótipo complexo; CN: cariótipo normal.



Fonte: O autor (2022).

Tabela 9 - Expressão do *PARP3* e sua relação com variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes nas três coortes; CC: cariótipo complexo/ CN: cariótipo normal; a. Teste exato de Fisher/ b. Teste qui-quadrado.

	Coorte Recife			Coorte TCGA			Coorte GSE		
	<i>PARP3</i>		Valor <i>p</i>	<i>PARP3</i>		Valor <i>p</i>	<i>PARP3</i>		Valor <i>p</i>
	Baixa expressão	Alta expressão		Baixa expressão	Alta expressão		Baixa expressão	Alta expressão	
Sexo			0,263a			0,639a			0,514a
Masculino	28 (30%)	64 (70%)		32 (35%)	60 (65%)		50 (42%)	69 (58%)	
Feminino	32 (40%)	49 (60%)		31 (38%)	50 (62%)		47 (37%)	79 (63%)	
Subtipo FAB			0,385b			0,000b			0,000b
M0	2 (40%)	3 (60%)		4 (25%)	12 (75%)		3 (50%)	3 (50%)	
M1	1 (8%)	11 (92%)		13 (30%)	31 (70%)		21 (39%)	33 (61%)	
M2	10 (35%)	19 (65%)		16 (42%)	22 (58%)		25 (48%)	27 (52%)	
M3	0 (0%)	0 (0%)		16 (100%)	0 (0%)		16 (89%)	2 (11%)	
M4	8 (38%)	13 (62%)		13 (38%)	21 (62%)		12 (30%)	28 (70%)	
M5	3 (38%)	5 (62%)		0 (0%)	18 (100%)		6 (12%)	46 (88%)	
M6	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	2 (100%)		1 (33%)	2 (67%)	
M7	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	3 (100%)		0 (0%)	0 (0%)	
Citogenética			0,311b			0,000b			0,000b
CN	4 (27%)	11 (73%)		20 (26%)	56 (74%)		31 (35%)	71 (53%)	
CC	2 (40%)	3 (60%)		6 (32%)	13 (68%)		3 (38%)	5 (63%)	
CBF-leukemia	5 (0,63%)	3 (37%)		11 (65%)	6 (35%)		22 (54%)	19 (46%)	
PML-RARA	0 (0%)	0 (0%)		15 (100%)	0 (0%)		16 (89%)	2 (11%)	
Outros	1 (20%)	4 (80%)		11 (31%)	25 (69%)		25 (33%)	51 (67%)	
Risco citogenético			0,235b			0,000b			0,000b
Favorável	6 (60%)	4 (40%)		27 (84%)	5 (16%)		38 (66%)	20 (34%)	
Intermediário	5 (28%)	13 (72%)		26 (26%)	75 (74%)		42 (29%)	104 (71%)	
Desfavorável	2 (33%)	4 (67%)		12 (32%)	25 (68%)		14 (40%)	21 (60%)	

Fonte: O autor (2022).

5.4.4 Expressão seu impacto no desfecho clínico dos pacientes LMA

5.4.4.1 Coorte Recife

Não foi observada variação na sobrevida global entre os grupos de baixa e alta expressão ($p=0,478$). Nesta coorte, o tempo médio de sobrevida foi de 18,72 meses (IC95%: 9,98-27,48) (Figura 13 - a).

Contudo, pacientes com baixos níveis de expressão demonstraram ter uma diminuição na SLD (0,047) (Figura 13 - b).

5.4.4.2 Coorte TCGA

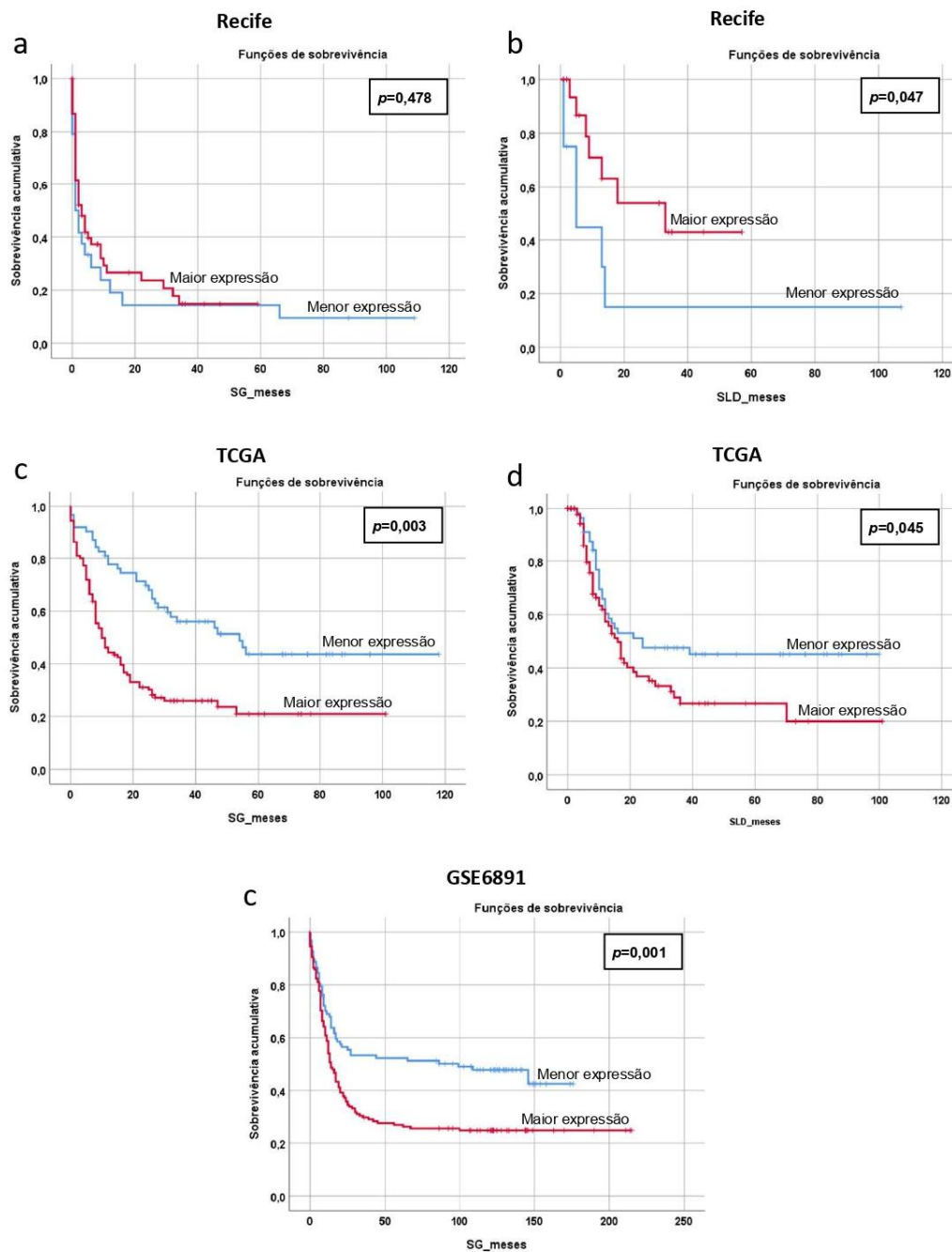
Possuindo tempo médio de sobrevida de 44,9 meses (IC95%: 37,2-52,6), assim como ocorreu com *PARP2*, pacientes pertencentes ao grupo de alta expressão (36,7 meses) apresentaram diminuição do tempo de sobrevida comparados com o grupo de baixa expressão (54,7 meses) ($p=0,003$) (Figura 13 - c).

No que toca o tempo de SLD, a média foi de 43,1 meses (IC95%: 35,5-50,7). Da mesma forma que foi observado na SG, o grupo de alto nível de expressão apresentou uma diminuição significativa do tempo de SLD (34,6 meses) comparado ao de baixo nível de expressão (52 meses) ($p=0,045$) (Figura 13 - c) diferentemente do achado na coorte anterior.

5.4.4.3 Coorte GSE6891

A média de tempo de sobrevida global da coorte do GSE foi de 81,4 meses (IC95%: 69,3-93,5). Concordando com os achados da coorte do TCGA, pacientes que apresentaram altos níveis de expressão de *PARP3* demonstraram uma diminuição significativa na sobrevida global (63,9 meses) comparados a um maior tempo de sobrevida do grupo de baixa expressão (91,4 meses) ($p=0,001$) (Figura 13 - e).

Figura 13 - Análise de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) dos pacientes das coortes de Recife (a, b); TCGA (c, d); GSE (e), referentes ao gene *PARP3*.



Fonte: O autor (2022).

6 DISCUSSÃO

Apesar de ser a análise citogenética uma das principais ferramentas de estratificação de risco e estabelecimento de prognóstico de pacientes com LMA, na coorte Recife, apenas 43,2% dos pacientes tiveram seu risco citogenético determinado, o que demonstra um cenário alarmante, uma vez que limita de forma significativa a definição de uma abordagem terapêutica considerada melhor adaptada para cada risco.

Dos pacientes que tiveram seus perfis citogenéticos determinados, a maior parte era pertencente ao grupo de risco intermediário. Este resultado está de acordo com os achados da coorte do TCGA e do GSE, assim como, de diversos outros trabalhos que demonstraram que o grupo de risco intermediário tem a maior frequência entre os pacientes, seguido do grupo de risco favorável e, então, o grupo de risco desfavorável (MROZEK et al., 2012; GRIMWADE et al., 2010; APPELBAUM et al., 2006). Ademais, 49% da coorte Recife fazem parte ao grupo com cariótipo normal, assim como, 46% da coorte do TCGA e 42% do GSE. Tais valores estão alinhados com dados da literatura que demonstram que cerca da metade dos pacientes com LMA apresentam CN (WELCH et al. 2012; GRIMWADE et al., 2010). Da mesma forma, esses achados reforçam a necessidade de maiores buscas de marcadores de prognóstico a fim da obtenção de uma melhor estratificação de risco.

Em nosso estudo, evidenciamos que pacientes do grupo de risco desfavorável apresentaram maiores níveis de expressão na coorte Recife e TCGA, diferentemente da GSE. Do mesmo modo, a maior parte dos pacientes com CC apresentou níveis elevados de expressão de *PARP1* em ambas as coortes. Grupo, o qual, apresenta piores respostas ao tratamento.

Os resultados supracitados estão de acordo com os achados por Pashaiefar e colaboradores, nos quais pacientes com CC apresentaram maiores níveis de expressão de *PARP1*, quando comparado com os outros grupos. Ainda em seu trabalho, também foi demonstrado que a hiperexpressão de tal gene foi associada a uma piora na sobrevida global dos pacientes com LMA, do mesmo modo, uma pior sobrevida livre de doença. De fato, em nosso

trabalho, demonstramos uma associação entre a expressão elevada de *PARP1* e diminuição da sobrevida global nas coortes do TCGA e GSE.

A expressão de *PARP1* também foi estudada em outras neoplasias hematológicas, como, por exemplo, o estudo de Kruk et al., no qual a sua hiperexpressão foi demonstrada estar relacionada a uma pior resposta ao tratamento de crianças com leucemia linfocítica aguda. Semelhantemente, níveis elevados de expressão de *PARP1* foram correlacionados com categorias de maiores riscos de síndrome mielodisplásicas (DIAMANTOPOULOS et al., 2017).

Sendo assim, é possível que a regulação positiva dos genes relacionados ao reparo de dano ao DNA dupla fita, como *PARP1*, possa fornecer às células cancerígenas mecanismos de escape da barreira anticâncer e, assim, induzir resistência à quimioterapia, acarretando em um maior índice de morte da doença.

Em relação à *PARP2*, assim como encontrado nas análises de expressão de *PARP1*, foi observado que nas coortes de Recife e TCGA, diferentemente da GSE, pacientes do grupo de risco desfavorável apresentaram maiores níveis de expressão. Outro ponto importante a ser salientado é o fato de que nas 3 coortes, a maior parte dos pacientes com CC demonstraram ter maiores níveis de expressão.

Todavia, ainda é bastante escassa a realização de estudos abordando a expressão de *PARP2* em neoplasias hematológicas.

A observação de que os camundongos com deleção dupla *PARP2* são altamente sensíveis à radiação ionizante e a agentes alquilantes foi a primeira indicação do envolvimento da *PARP2* na estabilidade genômica e um dos únicos estudos investigando seu papel em células sanguíneas. Os camundongos com deleção dupla de *PARP2* exibiram anemia crônica nas condições de estresse, além de um aumento da sensibilidade à radiação ionizante (IR) e agentes alquilantes. De fato, sabe-se que a gravidade da apoptose das células hematopoiéticas induzida em resposta à irradiação durante a fase aguda e a capacidade das HSPCs (do inglês, *Hematopoietic*

stem and progenitor cells) de substituir as células danificadas durante a fase de recuperação, ditam a radiosensibilidade no compartimento hematopoiético (FARRÉS et al., 2013). No mais, além da instabilidade genômica, alguns autores, por exemplo, relacionam a atividade da PARP2 a outras características tumorais, como angiogênese, inflamação, sinalização celular, entre outros (HANAHAHAN et al. 2011).

De fato, observamos que nas coortes do TCGA e GSE houve uma diminuição significativa na sobrevida dos pacientes categorizados com alto nível de expressão de *PARP2*, demonstrando um impacto negativo da hiperexpressão de tal gene nos pacientes com LMA das nossas coortes de estudo. Este resultado, certamente, também corrobora com o fato de *PARP2* ter sido encontrado mais expresso no grupo de risco desfavorável, assim como, entre os pacientes com cariótipo complexo.

No caso de gene *PARP3*, o déficit de estudos relatando seu impacto na formação de tumores é ainda mais escasso que *PARP2*.

De acordo com a literatura, a proteína PARP3 está envolvida no reparo de DNA por NHEJ em sua via clássica. Ademais, foi relatado que a perda de *PARP3* leva a redução da eficiência da NHEJ, tornando as células mais sensíveis a drogas antitumorais geradoras de quebra de dupla fita de DNA (Beck et al., 2014). Tal evidência também pode demonstrar uma possível relação com a formação de translocações.

Apesar de não haver uma diferença estatística significativa entre os grupos na coorte de Recife, é possível observar que em todas as coortes, mais de 70% dos pacientes do grupo de risco intermediário possuíam níveis mais elevados da expressão de *PARP3*. No mesmo sentido, mais de 70% dos pacientes nas três coortes pertenciam ao grupo de CN. É notória a heterogeneidade de resposta à terapia neste grupo e, por isso, esses indivíduos possuem um diagnóstico bastante variado. Nossos achados demonstram uma possível contribuição na busca de uma melhor estratificação de risco dos mesmos.

Outro ponto importante a ser frisado é o fato de que 100% dos pacientes PML-RARA da coorte do TCGA apresentaram baixos níveis de expressão de *PARP3*, assim como 89% dos pacientes PML-RARA da coorte do GSE.

PML-RARA é uma oncoproteína de fusão gerada a partir da t(15,17), dando origem a um subtipo distinto de LMA tanto do ponto de vista genético, quanto clínico, conhecida como Leucemia Promielocítica Aguda (LPA). Tal proteína desempenha papel central na progressão e tratamento da enfermidade, por causar a inibição a diferenciação terminal das células, uma vez que é capaz de recrutar complexos correpressores transcricionais a fim de suprimir a expressão gênica. Tal subgrupo de LMA é considerado de risco favorável, uma vez que a utilização do ácido all-trans retinóico (ATRA) desfaz o bloqueio transcricional (VOISSET et al 2018; ESPOSITO et al, 2014).

Alguns estudos demonstram que LMA relacionadas a repressores de transcrição, como é o caso de PML-RARA, são altamente sensíveis à inibição de PARP, em parte devido à sua expressão reprimida de genes associados à recombinação homóloga, assim como, a sua resposta comprometida a danos de DNA (ESPOSITO et al, 2014).

Sendo assim, nossos achados demonstrando que níveis elevados de expressão de *PARP3* impactaram em uma diminuição da sobrevida global em indivíduos com LMA, ao passo que pacientes com PML-RARA apresentaram baixos níveis de expressão, sendo esse subgrupo considerado como risco favorável, corroboram com nossa hipótese de que o aumento da expressão de *PARP3* pode conferir um pior prognóstico aos pacientes com LMA.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo é um dos pioneiros a demonstrar o impacto negativo da expressão elevada dos genes *PARP1*, *PARP2* e *PARP3* em coortes de pacientes com LMA. Pacientes com maiores níveis de expressão apresentaram uma diminuição significativa da sobrevida global, assim como, o nível de expressão de tais genes demonstrou variar entre os grupos de prognósticos citogenéticos, estando mais elevado nos grupos de pior prognóstico.

REFERÊNCIAS

- AME, J.C.; ROLLI, V.; SCHREIBER, V.; NIEDERGANG, C.; APIOU, F.; DECKER, P.; MULLER, S.; HOGER, T.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; DE MURCIA, G. *PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase*. **J. Biol. Chem.**, v. 274 (25), 1999, p. 17860–17868.
- AMÉ J. C.; SPENLEHAUER C.; DE MURCIA G. *The PARP super-family*. **BioEssays**. 2004; v. 26(8), p. 882–893. [PubMed: 15273990].
- ANDERSEN, M.T.; ANDERSEN, M.K.; CHRISTIANSEN D.H.; PEDERSEN-BJERGAARD, J. *NPM1 mutations in therapy-related acute myeloid leukemia with uncharacteristic features*. **Leukemia**. 2008;v. 22(5), p.951-955.
- ANDERSSON, A.; JOHANSSON B.; LASSEN C.; MITELMAN F.; BILLSTRÖM, R.; FIORETOS, T. *Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients*. **European Journal of Haematology**, v.72, 2004, p. 307–313.
- ALVAREZ-GONZALEZ, R.; JACOBSON, M. K. **Biochemistry**, 1987, v. 26, p. 3218–3224.
- ALTHAUS, F.R.; BACHMANN, S.; HOFFERER, L.; KLECZKOWSKA, H.E.; MALANGA, M.; PANZETER, P.L.; REALINI, C.; ZWEIFEL, B. *Interactions of poly(ADP-ribose) with nuclear proteins*. **Biochimie**, 1995, 77 (6), 423–432.
- ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **The American Society of Hematology**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016.
- BAI, P.; CANTO, C.; BRUNYANSZKI, A.; HUBER, A.; et al. 2011. *PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure*. **Cell Metab.**, 2011, v. 13 (4), p. 450–460.
- BAI, P.; HOUTEN, S.M.; HUBER, A.; et al. *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 [corrected] controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor gamma [corrected] heterodimer*. **J. Biol. Chem.** 2007, v. 282 (52), p. 37738–37746.
- BAIN, J. B. **Diagnóstico em Leucemias**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- BECK, C.; ROBERT, I.; REINA-SAN-MARTIN B.; SCHREIBER V.; DANTZER, F. *Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3*. **Exp Cell Res**. 2014;v. 329(1):p. 18–25. Epub 2014/07/16.
- BELOUSOVA, E.A.; ISHCHENKO, A. A.; LAVRIK, O.I. *DNA is a New Target of Parp3*. **Sci Rep**. 2018.

- BENJAMIN, R. C.; GILL, D. M. (1980) **J. Biol. Chem.** 255, 10502–10508.
- BENNETT, J. M.; CATOVSKY D.; DANIEL M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON D. A.; GRALNICK H.R.; SULTAN, C. *Proposals for the classification of the acute leukaemias. FrenchAmerican-British (FAB) co-operative group.* **Br J Haematol** v. 33, 1976, p. 451-458
- BOEHLER, C. DANTZER, F. *PARP-3, a DNA-dependent PARP with emerging roles in double-strand break repair and mitotic progression.* **Cell Cycle**, v. 10, 2011, p. 1023–1024.
- BOEHLER, C.; GAUTHIER, L.R.; MORTUSEWICZ, O.; et al. *Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression.* **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 108 (2011), p. 2783–2788.
- BONNET, D.; DICK, J. E. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.* **Nat.Med.**, v. 3, n. 7, p. 730-737, 1997.
- BREEMS, D. A.; VAN PUTTEN, W. L.; DE GREEF, G. E.; VAN ZELDEREN-BHOLA, S. L.; GERSSEN-SCHOORL, K. B.; MELLINK, C. H. et al. *Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype.* **J.Clin.Oncol.**, v. 26, n. 29, p. 4791-4797, 2008.
- BROCHU, G., DUCHAINE, C., THIBEAULT, L., LAGUEUX, J., SHAH, G.M., POIRIER, G.G., 1994. *Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase.* **Biochim. Biophys. Acta** 1219 (2), p. 342–350.
- BURZIO, L.O.; RIQUELME, P.T.; KOIDE, S.S. *ADP ribosylation of rat liver nucleosomal core histones.* **J. Biol. Chem**, v. 254 (8), 1979, p. 3029–3037
- BYRD, J. C.; MROZEK, K.; DODGE, R. K.; CARROLL, A. J.; EDWARDS, C. G.; ARTHUR, D. C. et al. *Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461).* **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4325-4336, 2002.
- CALDECOTT, K. W.; MCKEOWN, C. K.; TUCKER, J. D.; LJUNGQUIST, S.; THOMPSON, L. H. *An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III.* **Mol. Cell. Biol**, v. 14, p. 68–76 (1994).
- CARTER-O'CONNELL I, JIN H, MORGAN RK, DAVID LL, COHEN MS. *Engineering the substrate specificity of ADP-ribosyltransferases for identifying direct protein targets.* **J Am Chem Soc.** 2014; v. 136, p. 5201–5204. [PubMed: 24641686].
- COPPOLA, S.; NOSSERI, C.; MARESCA, V.; GHIBELLI, L. (1995) **Exp. Cell Res.** V. 221, p. 462–469.

- CHAMBON P.; WEILL J.D.; MANDEL, P. *Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 11, 1963, p. 39–43.
- D'AMOURS, D.; DESNOYERS, S.; D'SILVA, I.; POIRIER, G. G. *Poly(ADP-ribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions*. **Biochem J**. 1999; 342(2), p. 249–68. [PubMed: 10455009].
- DANTZER, F.; MARK, M.; QUENET D.; et al. Poly(ADPribose) polymerase2 contributes to the APLF and role in the DNA damage response. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 2006, 107, 9129–9134.
- DANTZER, F.; SANTORO, R. *The expanding role of PARPs in the establishment and maintenance of heterochromatin*. **The FEBS journal**, v. 280 (2013), p. 3508–3518.
- DANTZER, F.; SCHREIBER, V.; NIEDERGANG, C.; TRUCCO, C.; FLATTER, E.; DE LA RUBIA, G.; OLIVER, J.; ROLLI, V.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; DE MURCIA, G. *Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair*. **Biochimie**. 1999; 81:69–75. [PubMed: 10214912].
- DAS, S. K.; BERGER, N. A. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 1986, v. 137, p. 1153–1158.
- DESCHLER, B. ; LUBBERT, M. *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. **Cancer**, v. 107, n. 9, p. 2099-2107, 2006.
- DIAMANTOPOULOS, P.; ZERVAKIS, K.; ZERVAKIS, P.; et al. *Poly (ADP-ribose) polymerase 1 mRNA levels strongly correlate with the prognosis of myelodysplastic syndromes*. **Blood Cancer Journal**. 2017
- DI CROCE, L., RAKER, V. A.; CORSARO, M.; et al. *Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor*. **Science**. 2002;v. 295, p. 1079-1082.
- DOHNER, H.; ESTEY, E. H.; AMADORI, S.; APPELBAUM, F. R.; BUCHNER, T.; BURNETT, A. K. et al. *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 453-474, 2010.
- EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, y. *Cancer Res.*, v. 57, 1835–1840.
- LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A. F.; KUSHNLE, S.; NICOTERA, P. J. **Exp. Med**. V. 185, 1997, p. 1481–1486.
- ESTEY, E. *Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis risk stratification and management*. **American Journal Hematololy**, 2012 Jan; vol. 87(1), p. 89-99.

EUSTERMANN, S. VIDELER, H. YANG, J.C. COLE, P.T. GRUSZKA, D. VEPRINTSEV, D. NEUHAUS, D. *The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger.* **J. Mol. Biol.** V. 407, 2011, p. 149–170.

FALINI, B.; ALBIERO, E.; BOLLI, N.; DE MARCO, M. F.; MADEO, D.; MARTELLI, M. et al. *Aberrant cytoplasmic expression of C-terminal-truncated NPM leukaemic mutant is dictated by tryptophans loss and a new NES motif.* **Leukemia**, v. 21, n. 9, p. 2052-2054, 2007.

FALINI, B.; MARTELLI, M.P., BOLLI, N.; SPORTOLETTI, P.; LISO, A.; TIACCI, E.; HAFERLACH, T. *Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?* **Blood**, v. 117, 2011, p. 1109-1120.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. **Diagnóstico laboratorial das leucemias Linfóides agudas.** Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/hqbmPwpLN5tLzxRX3kdnSpg/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 02/08/2021.

FARRÉS, J.; LLACUNA, L.; MARTIN-CABALLERO, J.; MARTÍNEZ, C.; LOZANO, J.J.; et al. *PARP-2 sustains erythropoiesis in mice by limiting replicative stress in erythroid progenitors.* **Cell Death Differ**, 2015; 22: 1144-57

FARRÉS, J.; MARTÍN-CABALLERO, J.; MARTÍNEZ, C.; et al. *Parp-2 is required to maintain hematopoiesis following sublethal γ -irradiation in mice.* **Blood** 2013; 122, pág. 44-54.

FERNANDEZ, A.; RIBEIRO, J. M.; COSTAS, M. J.; PINTO, R. M.; CANALES, J.; CAMESELLE, J. C. **Biochim. Biophys. Acta**, 1290, 1996, pág. 121–127.

FERNANDEZ H. F.; SUN Z.; YAO X.; et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, 2009, vol. 361, pág.1249–1259.

Ferrara, F. Schiffer, C.A. **Acute myeloid leukaemia in adults** Lancet, v. 381 (9865), 2013, pág. 484-495.

FERRO, A. M.; OPPENHEIMER, N. J. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 1978, v. 75, pág. 809–881.

FOLLOWS G.A.; TAGOH, H., LEFEVRE. P., HODGE D.; et al. *Epigenetic consequences of AML1-ETO action at the human c-FMS locus.* **EMBO J.** 2003; 22, pág. 2798-2809.

GOODWIN, P. M.; LEWIS, P. J.; DAVIES, M. I.; SKIDMORE, C. J.; et al. **Biochim. Biophys. Acta**, 543, pág. 576–582.

GOTTSCHALK, A. J.; TIMINSZKY, G.; KONG, S. E.; et al. *Poly(ADP-ribose)ylation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009; 106(33):13770–4. [PubMed: 19666485].

GREENWOOD, M. J.; SEFTEL, M. D.; RICHARDSON, C.; BARBARIC, D.; et al. *Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia*. **Leukemia Lymphoma** v47, p.1245-1252, 2006.

GRIMWADE, D.; HILLS, R. K. *Independent prognostic factors for AML outcome*. **American Society of Hematology**, 385-395, 2009.

GRIMWADE, D.; VYAS, P.; FREEMAN, S. *Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia*. **Curr.Opin.Oncol**, v. 22, n. 6, p. 656-663, 2010.

GRIMWADE, D.; WALKER, H.; OLIVER, F.; WHEATLEY, K.; HARRISON, C.; HARRISON, G. et al. *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial*. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2322-2333, 1998.

HAKEM, R. 2008. *DNA damage repair: The good, the bad, and the ugly*. **EMBO J**. 27, 589–605.

HALL, G.W. *Childhood myeloid leukaemias*. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 14, n. 3, p. 573-91, 2001.

HANZLIKOVÁ, H.; GITTENS, W.; KREJCIKOVÁ, K.; ZENG, Z.; CALDECOTT, K. W. *Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin*. **Nucleic Acids Res**. 45, 2546–2557 (2017).

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**, 2011; 144: 646-674.

HASSA, P. O.; HOTTIGER, M. O. *The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases*. **Front. Biosci**. 13, 3046–3082.

HEIM, S.; MITELMAN, F. *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and molecular aberrations of tumor cells*. Second edition. Wiley-Liss, Inc. 1995.

HENRY, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. ed. 18ª. São Paulo: Manole, 1995, pág.814-816.

HESSON, L. B.; COOPER, W. N.; LATIF, F. *Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster*. **Oncogene**. 26, 7283–7301 (2007).

HILLYARD, D.; REICHSTEINER, M.; MANLAPAZ-RAMOS, P.; IMPERIAL, J. S.; CRUZ, L. J.; OLIVERA, B. M. **J. Biol. Chem**. 256, 8491–8497.

HIEBERT, S. W.; REED-INDERBITZIN, E. F.; AMANN, J.; IRVIN, B.; DURST, K.; LINGGI, B. *The t(8;21) fusion protein contacts co-repressors and histone*

deacetylases to repress the transcription of the p14ARF tumor suppressor. **Blood Cells Mol Dis.** 2003;30:177-183

HOCH, N. C. et al. *XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia.* **Nature** 541, 87–91 (2017).

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA)/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasi. **Coordenação de Prevenção e Vigilância**, p. 126, 2015. Rio de Janeiro.

ISABELLE, M.; MOREEL, X.; GAGNE, J. P.; ROULEAU, M.; et al. *Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry.* **Proteome Sci.** 2010; 8:22. [PubMed: 20388209].

JACOBY, M. A.; DE JESUS PIZARRO, R. E.; SHAO, J.; et al. *The DNA double-strand break response is abnormal in myeloblasts from patients with therapy-related acute myeloid leukemia.* **Leukemia.** 2013.

JACKSON S. P.; BARTEK, J. *The DNA damage response in human biology and disease.* **Nature.** 461, 1071–1078.

JOHANSSON, M. *A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues.* **Genomics** 57 (3), 442–445.

JUAREZ-SALINAS, H.; SIMS, J.L.; JACOBSON, M.K. *Poly(ADP-ribose) levels in carcinogentreated cells.* **Nature** 282 (5740), pág. 740–741.

JUNOD, A. F.; JORNOT, L.; PETERSON, H. **J. Cell. Physiol.** 140, pág. 177–185.

KAMASHEV, D.; VITOUX, D.; DE THE, H. *PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/cAMP cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation.* **J Exp Med.** 2004;199:1163-1174.

KLEINE, H.; POREBA, E.; LESNIEWICZ, K.; et al. **Mol. Cell** 32, pág. 57–69.

KIM, M.Y.; MAURO, S.; GEVRY, N., LIS, J.T., KRAUS, W.L. *NADp-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1.* **Cell** 119 (6), 803–814

KREIMEYER, A.; WIELCKENS, K.; ADAMIETZ, P.; HILZ, H. **J. Biol. Chem.** 259, 890–896.

KRISHNAKUMAR, R.; KRAUS, W.L. *The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets.* **Mol. Cell** 39 (1), 8–24.

- KRTOLICA, ANA. *Role of Microenvironment in Regulating Stem Cell and Tumor, Initiating Cancer Cell Behavior and Its Potential Therapeutic Implications*. **Stem Cells and Cancer Stem Cells**, 2013, Vol.11,159-169.
- LANGELIER, M.F.; PLANCK, J.L.; ROY, S.; et al. *Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity*, **J. Biol. Chem.** 286 (2011) 10690–10701.
- LANGELIER, M.F.; PLANCK, J.L.; ROY, S.; PASCAL, J.M., 2012. *Structural basis for DNA damage dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1*. **Science** 336 (6082), 728–732.
- LANGELIER, M.F.; RICCIO, A.A.; PASCAL, J.M. *PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1*, **Nucleic Acid Res.** 42 (2014) 7762–7775, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku474>.
- LAPIDOT, T.; SIRARD, C.; et al. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645-648, 1994.
- LEGER, K.; BAR, D.; SAVIC, N.; et al. *ARTD2 activity is stimulated by RNA*. *Nucleic acids research*. 2014.
- LEHTIO, L.; JEMTH, A. S.; COLLINS, R.; et al. **J. Med. Chem.** 52, 3108–3111.
- LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A. F.; KUSHNLE, S.; NICOTERA, P. (1997) **J. Exp. Med.** 185, 1481–1486.
- LERMAN, M. I.; MINNA, J. D. *The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes*. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. **Cancer Res.** 60, 6116–6133 (2000).
- LIANG, Y. C.; HSU, C. Y.; YAO, Y. L. *PARP-2 regulates cell cycle-related genes through histone deacetylation and methylation independently of POLY(ADP-ribosylation)*. **Biochem Biophys Res Commun** 2013; 431: 58-64.
- LIESNER, R.J.; GOLDSTONE, A. H. *ABC of clinical haematology: the acute leukemias*. **Br J Haematol**, n. 314, p. 733, 1997.
- LOETSCHER, P.; ALVAREZ-GONZALEZ, R.; ALTHAUS, F. R. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 84, 1286–1289
- LOOK, A. T. *Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias*. **Science**, 1997; 278:1059–64
- LORENZI, T. F. et al. *Hematologia e Hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica*. São Paulo: **Atheneu**, 2005.

LUSIS, M. K. P. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. **Rev. bras. hematol. Hemoter.** 22, 175-178, 2000.

STONE, R.; O'DONNELL, M.; SEKERESFIA, M. *Acute Myeloid Leukemia, American Society of Hematology*, **Hematology** 2004: 99-111.

MAEDA, Y.; HUNTER, T.C.; LOUDY, D.E.; DAVE, V.; et al. *PARP-2 interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-B.* **J. Biol. Chem.** 281 (14), 9600–9606.

MARTIN, P. J.; COUNTS JR., G. W.; APPELBAUM, F. R.; et al. *Life expectancy in patients surviving more than 5 years after hematopoietic cell transplantation.* **Journal Clinical Oncology** 2010;vol.28:1011–1016

MENISSIER DE MURCIA, J.; RICOUL, M.; et al. *Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse.* **EMBO J.** 22 (9), 2255–2263.

MINAGA, T.; KUN, E. *Probable helical conformation of poly(ADP-ribose). The effect of cations on spectral properties.* **J. Biol. Chem.** 258 (9), 5726–5730.

MIRO, A.; COSTAS, M. J.; GARCIA-DIAZ, M.; HERNANDEZ, M. T. AND CAMESELL, J. C. (1989) **FEBS Lett.** 244, 123–126.

MIWA, M.; SAIKAWA, N.; YAMAIZUMI, Z.; et al. *Structure of poly(adenosine diphosphate ribose): identification of 2' O -[1' O -ribose]-2' O -(or 3' O -)(1' O -ribose)]adenosine-5' O ,5' O ,5' O -tris(phosphate) as a branch linkage.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 76 (2), 595–599

MROZEK, K.; HEINONEN, K.; BLOOMFIELD, C. D. *Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia.* **Best.Pract.Res.Clin.Haematol.**, v. 14, n. 1, p. 19-47, 2001.

MRÓZEK, K.; MARCUCCI, G.; NICOLET, D.; et al. *Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia.* **Journal of Clinical Oncology** v.30, p.4515-4523, 2012.

MURER, B. *Targeted therapy in non-small cell lung cancer: a commentary.* **Arch Path Lab Med** 2008; (132):1573-1575.

NAOUM, F. A.; NAOUM, P.C. *Hematologia Laboratorial – Leucócitos*, 1 ed. **Academia de Ciências e Tecnologia**, São Jose do Rio Preto, 2006, pag.91-98.

NASLAVSKY, M. S. et al. *Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database.* **Human Mutation.** Acessado em: 23 mar. 2021.

NICOLAS, L.; MARTINEZ, C.; BARO, C.; et al. *Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-2 leads to rapid development of spontaneous T-cell lymphomas in p53-deficient mice.* **Oncogene.** 2010; 29:2877–2883. [PubMed: 20154718].

NIMER, S. D. *Is it important to decipher the heterogeneity of "normal karyotype AML"?* **Best.Pract.Res.Clin.Haematol.**, v. 21, n. 1, p. 43-52, 2008.

NOMURA, F.; YAGUCHI, M.; TOGAWA, A.; MIYAZAKI, M.; et al. *Enhancement of poly-adenosine diphosphate-ribosylation in human hepatocellular carcinoma.* **J Gastroenterol Hepatol.** 2000; 15(5):529–35. [PubMed: 10847440]

NOSHO, K.; YAMAMOTO, H.; MIKAMI, M.; et al. *Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis.* **EUROPEAN JOURNAL OF CANCER**, 42(2006), pág. 2374–2381.

OKA, S.; KATO, J.; MOSS, J., 2006. *Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase.* **J. Biol. Chem.** 281 (2), 705–713.

OKAYAMA, H.; EDSON, C.M.; FUKUSHIMA, M.; et al. *Purification and properties of poly(adenosine diphosphate ribose) synthetase.* **J. Biol. Chem.** 252 (20), 7000–7005.

OSSOVSKAYA, V.; KOO, I. C.; KALDJIAN, E. P.; et al. *Upregulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (Parp1) in Triple-Negative Breast Cancer And Other Primary Human Tumor Types.* **Genes Cancer.** 2010; 8:812–21. [PubMed: 21779467].

PABST, T.; MUELLER, B. U.; HAKAWA, N.; et al. *AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia.* **Nat Med.** 2001; 7:444- 451.

PASCHKA, P.; MARCUCCI, G.; RUPPERT, A. S.; et al. *Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study.* **J Clinic Oncol** 2006; vol. 24:3904–3911.

PELLOSO, Luís A. F., et al. *Cáriotipo em Leucemia Mielóide Aguda: Importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico.* Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v49n2/16208.pdf>. Acesso em: 10/12/2020.

POIRIER, G. G.; DE MURCIA, G.; JONGSTRA-BILEN, J.; NIEDERGANG, C.; MANDEL, P. *Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure.* **Proc Nat Acad Sci U S A.** 1982; 79(11):3423–7.

RANKIN, P. W.; JACOBSON, M. K.; MITCHELL, V. R.; BUSBEE, D. L. **Cancer Res.**, 1980, v. 40, pág. 1803–1807.

ROCKOVA, V.; ABBAS, S.; WOUTERS, B. J.; et al. *Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers.* **Blood**, v.118, p.1069-1076, 2011.

ROULEAU, M.; EL-ALFY, M.; LÉVESQUE, M. H.; POIRIER, G. G. *Assessment of PARP-3 distribution in tissues of cynomolgous monkeys.* **J. Histochem. Cytochem**, v. 57; pág. 675–685; 2009.

ROULEAU, M.; MCDONALD, D.; GAGNE, P.; et al. *PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery.* **J. Cell Biochem**, v. 100, 2007, pág. 385–401.

RULTEN, S.L. FISHER, A.E. ROBERT, I. ZUMA, M.C. ROULEAU, M. JUL, POIRIER, G. REINA-SAN-MARTIN, B. CALDECOTT, K.W. *PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining.* **Mol. Cell**, v.41, , 2011, pág. 33–45.

SCHLENK R. F.; DÖHNER K.; KRAUTER J.; et al. *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.* **N Engl J Med**. 2008, v. 358(18), pág. 1909-1918.

SCHRAUFSTATTER, I. U.; HYSLOP, P. A.; HINSHAW, D. B.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986, v. 83, p. 4908–4912.

SCHREIBER, V.; AME, J. C.; DOLLE, P.; SCHULTZ, I.; et al. *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1.* **The Journal of biological chemistry**. 2002; 277:23028–23036. [PubMed: 11948190].

SEKERES, M. A. ; STONE, R. M. *The challenge of acute myeloid leukemia in older patients.* **Curr.Opin.Oncol**, v. 14, n. 1, p. 24-30, 2002.

SKIDMORE, C. J., DAVIES, M. I., GOODWIN, P. O. M., HALLDORSON, H., LEWIS, P. J., SHALL, S. AND ZIA 'EE, A. (1979) *Eur. J. Biochem.* V. 101, p. 135–142.

SIMSEK D, JASIN M. *Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation.* **Nat Struct Mol Biol**. 2010;v. 17(n. 4), p. 410-416.

SLOVAK, M. L.; KOPECKY, K. J.; CASSILETH, P. A.; HARRINGTON, D. H.; THEIL, K. S.; MOHAMED, A. et al. *Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study.* **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4075-4083, 2000.

SPECK N. A.; GILLILAND D.G. *Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia.* **Nat Rev Cancer**. 2002;v. 2(nº 7), p. 502-513.

STORER B.; ESTEY E., et al. *Outcome of patients with acute myeloid leukemia with monosomal karyotype who undergo hematopoietic cell transplantation.* **Blood**, 2011, v.118, p. 1490–1494.

SUZUKI, H., QUESADA, P., FARINA, B., LEONE, E., 1986. *In vitro poly(ADP-ribose)ylation of seminal ribonuclease*. **J. Biol. Chem.** 261, 2013, pág. 6048–6055

SZCZEPANSKI, T.; van VELDEN, V.H.J.; van DONGEN, J.J.M. *Classification systems for acute and chronic leukemias*. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 16, n. 4, p. 561-82, 2003.

TAKAHASHI. *Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia*. **J Hematol Oncol**. 2011, v. 4, pág. 36.

TONG W.M., HANDE M.P., LANDSORP P.M., WANG Z.Q. 2001. *DNA strand breaksensing molecule poly(ADP ribose)polymerase cooperates with p53 in telomere function, chromosome stability, and tumor suppression*. **Mol. Cell. Biol.** 21. 2001. pág. 4046–4054.

VARDIMAN, J. W.; THIELE, J.; ARBER, D. A.; BRUNNING, R. D.; BOROWITZ, M. J.; PORWIT, A. et al. *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-951, 2009.

VELLOSO E.D.R.P, MOTTA C.H.A.S, FURTADO J.B, BACAL N.S, SILVEIRA P.A.A, MOYSES C.B, SITNIK R E PINHO J.R.R. *Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies*. **Einstein**. V. 9, pág. 184-189, 2011.

VISSER O.; TRAMA A.; MAYNADIE M.; STILLER C.; MARCOS-GRAGERA R.; DE ANGELIS R.; MALLONE S.; TEREANU C.; ALLEMANI C.; RICARDI U. *Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe*. **Eur J Cancer** 2012; 48: 3257– 3266.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, 2ª edição. 1995. Wiley, New York.

VYAS, S. et al. *Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity*. **Nat. Commun.**, 5, 2014, pág. 4426.

WANG M.; WU W.; WU W.; et al. *PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways*. **Nucleic Acids Res.**, 2006;34(21): pág. 6170-6182.

WANG M., et al. *A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1*, *Science*, 2016, 354, pág. 6308.

WANG, Z.Q., STINGL, L., MORRISON, C., JANTSCH, M., LOS, M., SCHULZE-OSTHOFF, K., WAGNER, E.F. *PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis*. **Genes Dev.**, 1997, 11 (18), pág. 2347–2358.

WACKER, D.A.; RUHL, D.D.; BALAGAMWALA, E.H.; HOPE, K.M.; ZHANG, T., KRAUS, W.L. *The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription*. **Mol. Cell. Biol.** 2007, 27 (21), 7475–7485.

WELCH JS; LEY TJ, LINK DC; et al. *The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia*. **Cell**. 2012 Jul 20;150(2). Pág. 264-278. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.023.

WHISH, W. J. D., DAVIES, M. I. AND SHALL, S. (1975) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 65, 722–730

WHITEHOUSE, C. J. et al. *XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair*. **Cell**, 104, 2011, pág. 107–117.

WIELCKENS, K.; SCHMIDT, A.; GEORGE, B.; BREDEHORST, R.; HILZ, H. J. **Biol. Chem.**, 257, 1982, pág. 12872–12877.

WIELCKENS, K.; George, E., PLESS, T.; Hilz, H. **J. Biol. Chem.** 258, 1983, pág. 4098–4104.

WRIGHT, R.H.; BEATO, M. *PARty promoters: hormone-dependent gene regulation requires CDK2 activation of PARP1*. **Cell Cycle** (Georgetown Tex), 11 (2012). Pág. 4291–4293.

WRIGHT R.H.; LIOUTAS, A.; LE DILY, F.; SORONELLAS, D.; POHL, A.; BONET, J.; NACHT, A.S.; SAMINO, S.; FONT-MATEU, J; VICENT, G.P. et al. *ADP-ribose-derived nuclear ATPsynthesis by NUDIX5 is required for chromatin remodeling*. **Science** (NewYork, NY). 352 (2016). Pág.1221–1225.

YAMAMOTO, M. *Imunofenotipagem em leucemias mielóides agudas*. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 22, n. 2, p. 169-74, 2000.