



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

AMANDA MOREIRA GONÇALVES DE AGUIAR

**ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA MITOCONDRIAL (MTDNA) E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA A FÁRMACOS EM CÉLULAS DE LEUCEMIA  
MIELOIDE AGUDA**

Recife  
2024

AMANDA MOREIRA GONÇALVES DE AGUIAR

**ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA MITOCONDRIAL (MTDNA) E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA A FÁRMACOS EM CÉLULAS DE LEUCEMIA  
MIELOIDE AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre(a) em Genética e Biologia Molecular Área de concentração: Genética.

Orientador (a): Antonio Roberto Lucena de Araújo

Coorientador (a): Marcos André Cavalcanti Bezerra

Recife

2024

Catálogo na Fonte  
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva  
CRB4/1381

Aguiar, Amanda Moreira Gonçalves de.

Análise de conteúdo de DNA mitocondrial (MTDNA) e sua associação com resposta a fármacos em células de leucemia mieloide. / Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar . – 2024.

93 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo.

Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.

.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. LMA. 2. mtDNA. 3.Tratamento. 4.Glicólise. 5. Fosforilação oxidativa. I. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (Orient.). II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Coorient.). III. Título

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-048

**Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar**

**Análise da redução do conteúdo de DNA mitocondrial (mtDNA) e sua associação com resposta a fármacos em células de leucemia mieloide aguda**

**Aprovado em 02/02/2024**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Tercílio Calsa Junior**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**  
**Universidade do Ceará**

---

**Dra. Lorena Lobo de Figueiredo Pontes**  
**Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto**

**Recife**  
**2024**

Dedico este trabalho a minha avó Ilane Moreira, que virou a estrela mais brilhante do céu. Te amo eternamente.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM) pelo auxílio que me foi dado no decorrer do meu mestrado.

Ao meu orientador, Antonio Roberto, que se tornou tão especial para mim. Agradeço pelas correções e por me apoiar na minha carreira científica e também na vida. Que Deus te ilumine sempre. Ao meu coorientador, Marcos, por ser sempre atencioso comigo e me auxiliar sempre que necessário. Não tenho como colocar em palavras o quão agradecida eu estou.

Quero expressar minha gratidão à minha mãe, Alessandra, e à minha avó, Ilane, que sempre me apoiaram em minhas decisões profissionais e me ensinaram valores que vou levar por toda minha vida. Elas, que abdicaram de tantas coisas pra cuidar dos filhos e sempre mantiveram a cabeça erguida em situações difíceis. Espero um dia ter a capacidade de retribuir o que vocês fizeram por mim durante todos esses anos. Vovó, que foi uma guerreira por ter enfrentado o cancer até seu ultimo momento, te amo eternamente.

À minha tia-avó Sônia Leser: eu não seria metade da pessoa que me tornei se não fosse por você. Tia, obrigada por me guiar durante meu ensino médio e graduação. Obrigada por também me apoiar no mestrado. Obrigada por todo o teu amor e carinho. Que você continue sendo essa pessoa fantástica que não mede esforços para ajudar os outros. Eu te amo.

Ao meu irmão, Thiago, agradeço pelas risadas e pelo apoio no decorrer desse mestrado. Quantas vezes você me escutou sem nem entender da minha área, e ainda me deu conselhos. Tenho um orgulho imenso de você e torço pela sua felicidade. À minha cunhada, Monique, pela amizade e conforto que tenho sempre a disposição com você. Agradeço imensamente por todo apoio que me foi dado, fortalecendo minha jornada. Amo vocês.

Agradeço ao meu grupo de laboratório: Vitória, Lidiane, Márcio, Marcela, Isabelle, Juan, Diego e Pedro Luiz, que transformam a rotina em momentos divertidos e de conversas científicas. Vocês foram essenciais para a minha formação.

Aos amigos que estão presentes principalmente nessa fase do mestrado, Carlos, Manoela, Alexandre e Marcos, amo vocês e agradeço por terem tornando esse processo mais fácil. Agradeço a Manu que me recebeu na casa dela em Ribeirão, me

dando a oportunidade de vivenciar a rotina do laboratório e me trazer a certeza de que estou no lugar certo.

À Dammyres por ser essa pessoa extremamente iluminada. Te agradeço pela paciência, por me ouvir, por me entender e por estar comigo sempre que precisei. Para o que você precisar, estarei aqui.

Agradeço também a Guilherme, meu namorado, por me auxiliar nesse processo. Obrigada por todo apoio que você têm me dado, você é incrível!

Um abraço especial também ao pessoal do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) que me recebeu de braços abertos e com todo o carinho do mundo. Willyenne, Thayse, Morganna, Elisa, Bruno. Muitíssimo obrigada pelo carinho e por me auxiliarem.

Finalizo agradecendo ao CNPq por me dar o auxílio necessário nessa jornada.

No fim das contas, as descobertas são o que permanece. Estamos passando por este planeta por um curto período de tempo. Fazemos nosso trabalho, partimos e outros virão para continua-lo.  
(A decodificadora, Walter Isaacson 2021).

## RESUMO

Considerando que o metabolismo celular pode variar entre os diferentes tipos de leucemia mieloide aguda (LMA), o conteúdo do DNA mitocondrial (mtDNAc) pode representar uma ótima ferramenta para avaliar o perfil metabólico (glicolítico ou fosforilativo) de uma célula leucêmica. Com isso, inicialmente, avaliamos *in vitro* o impacto das variações fisiológicas do mtDNAc em 43 amostras de células mononucleares de pacientes com LMA frente ao tratamento com citarabina (100nM) por 48h. Após 48h de incubação, observamos como resultado uma correlação inversa entre mtDNAc e taxa de apoptose (Coeficiente de Pearson: -0,75, IC95%: -0,85 a -0,58), identificando maior resistência à citarabina em células com alto conteúdo de mtDNA. Na sequência, depletamos o mtDNAc de 11 dessas 43 amostras com alto mtDNAc por meio de RNA de interferência e comparamos de forma pareada a taxa de apoptose induzida por citarabina. Após 48h de cultura, blastos leucêmicos submetidos a depleção do mtDNAc se tornaram mais sensíveis a ação da citarabina ( $P < 0,001$ ). Finalmente, avaliamos o efeito desta depleção em linhagens celulares leucêmicas de metabolismos conhecidos (MV4-11, com metabolismo preferencialmente fosforilativo; OCI-AML3, com metabolismo preferencialmente glicolítico) frente a fármacos usados na prática clínica (citarabina e venetoclax) e de fármacos metabólicos reposicionados (metformina e metotrexato). Após depleção do mtDNAc, houve um aumento da apoptose na linhagem OCI-AML3 quando desafiada com altas doses de venetoclax e metformina, enquanto que a linhagem MV4-11 se tornou mais sensível ao tratamento com todas as drogas. Logo, conclui-se que depleção do mtDNAc demonstrou uma relação direta com uma resposta aprimorada a subgrupos específicos de fármacos usados no tratamento da LMA, especialmente para linhagens com metabolismo preferencialmente fosforilativo.

**Palavras-chave:** LMA, mtDNA, tratamento, glicólise, fosforilação oxidativa.

## ABSTRACT

Considering that cellular metabolism can vary among different types of acute myeloid leukemia (AML), mitochondrial DNA content (mtDNAc) may represent an excellent tool to assess the metabolic profile (glycolytic or oxidative phosphorylation) of leukemic cells. Thus, initially, we evaluated *in vitro* the impact of physiological variations of mtDNAc in 43 samples of mononuclear cells from AML patients treated with cytarabine (100nM) for 48h. After 48h of incubation, we observed an inverse correlation between mtDNAc and apoptosis rate as a result (Pearson's coefficient: -0.75, 95% CI: -0.85 to -0.58), identifying higher resistance to cytarabine in cells with high mtDNA content. Subsequently, we depleted mtDNAc from 11 of these 43 samples with high mtDNA content using shRNA and compared the apoptotic rate induced by cytarabine in a paired manner. After 48h of culture, leukemic blasts subjected to mtDNAc depletion became more sensitive to the action of cytarabine ( $P < 0.001$ ). Finally, we evaluated the effect of this depletion on leukemic cell lines with known metabolic profiles (MV4-11, with predominantly oxidative phosphorylation metabolism; OCI-AML3, with predominantly glycolytic metabolism) in response to drugs used in clinical practice (cytarabine and venetoclax) and repositioned metabolic drugs (metformin and methotrexate). After mtDNAc depletion, there was an increase in apoptosis in the OCI-AML3 lineage when challenged with high doses of venetoclax and metformin, while the MV4-11 lineage became more sensitive to treatment with all drugs. Therefore, it is concluded that mtDNAc depletion demonstrated a direct relationship with an enhanced response to specific subgroups of drugs used in the treatment of AML, especially for lineages with predominantly oxidative phosphorylation metabolism.

**Keywords:** AML, mtDNA, treatment, glycolysis, oxidative phosphorylation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo simplificado hierárquico da hematopoese. ....	18
Figura 2 - Aquisição de mutações somáticas desencadeia um processo conhecido como hematopoese clonal.....	20
Figura 3 - Processo de transformação leucêmica simplificado.....	21
Figura 4 - Estabelecimento e manutenção do bulk leucêmico. ....	22
Figura 5 - Evolução clonal da LMA.....	25
Figura 6- Categorias funcionais dos genes mutados na LMA. ....	27
Figura 7 - Metabolismo energético. ....	34
Figura 8 - Estrutura do DNA mitocondrial e suas variantes.....	37
Figura 9 - Linha do tempo de fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento da LMA.....	44
Figura 10 - Associação de quimioterapia convencional com fármacos antimetabólitos pode ser uma alternativa de tratamento. ....	47
Figura 11 - Obtenção de células mononucleares através da separação por ficoll. ...	51
Figura 12 - Avaliação das linhagens celulares de acordo com o lactato extracelular e consumo de oxigênio. ....	57
Figura 13 - Relação da taxa de apoptose e mtDNAc em células mononucleares após incubação com AraC. ....	62
Figura 14 - Relação do conteúdo de DNA mitocondrial e taxa de apoptose após utilização de shRNA. ....	64
Figura 15 - Redução do conteúdo de mtDNA após adição do fármaco lamivudina. .	65
Figura 16 - IC50 dos fármacos selecionados. ....	67
Figura 17 - Análise de apoptose em linhagem OCI-AML3. ....	69
Figura 18 - Análise de apoptose em linhagem MV4-11.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo da classificação da LMA de acordo com o Consenso Internacional de 2022. ....	31
Tabela 2 - Quantificação do DNA plasmidial.....	53
Tabela 3 - Sequência dos primers e tamanho esperado do produto.....	58
Tabela 4 - Porcentagem de apoptose tardia antes e após tratamento com lamivudina em células OCI-AML3. ....	68
Tabela 5 - Porcentagem de apoptose tardia antes e após tratamento com lamivudina em células MV4-11.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
AraC	Citarabina
BCL-2	Linfoma de células B 2
CEP	Comitê de ética e pesquisa
COX4	Citocromo C oxidase 4
CT	Cycle Threshold
CTH	Célula tronco hematopoética
CTL	Célula tronco leucêmica
CYTB	Citocromo B mitocondrial
ELN	European Leukemia Net
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAB	Franco Americano Britânico
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FLT3	Tirosina quinase <i>fms-like</i>
ICC	Classificação do consenso internacional
IDH	Isocitrato desidrogenase
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda

mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
OMS	Organização mundial da saúde
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PDH	Piruvato desidrogenase
PDK1	Piruvato quinase desidrogenase 1
PK1	Piruvato quinase 1
POLG	Polimerase gama
Qpcr	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RC	Remissão completa
Rrna	RNA ribossomal
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TCA	Ácido tricarboxílico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCTH	Transplante alogênico de células tronco hematopoéticas
tRNA	RNA transportador

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 HEMATOPOESE.....	17
2.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA).....	21
2.2.1 FISIOPATOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO.....	23
2.2.2 A ALTA HETEROGENEIDADE CELULAR ACARRETA EM HETEROGENEIDADE METABÓLICA.....	32
2.2.3 DNA MITOCONDRIAL.....	37
2.2.4 FATORES PROGNÓSTICOS E TRATAMENTO NA LMA.....	41
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 CASUÍSTICA.....	50
4.3 UTILIZAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA E O CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS EMPACOTADORAS VIRAIS.....	52
4.4 INFECÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES COM LENTIVÍRUS.....	55
4.5 AQUISIÇÃO DOS FÁRMACOS LAMIVUDINA, METFORMINA, VENETOCLAX, CITARABINA E METOTREXATO.....	55
4.6 CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES.....	56
4.7 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO MTDNA.....	57
4.8 ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT.....	59
4.9 ENSAIO DE APOPTOSE EM CÉLULAS LEUCÊMICAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA E LINHAGENS CELULARES.....	60
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5 RESULTADOS.....	62
6 DISCUSSÃO.....	72
7 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA (CEP).....	87
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	91

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de células sanguíneas, que compreende sua formação, desenvolvimento e diferenciação, constitui um processo fundamental conhecido como hematopoese. Este intrincado mecanismo ocorre exclusivamente na medula óssea de indivíduos adultos saudáveis, onde as células tronco hematopoéticas (CTH) desempenham um papel central. Com o avançar natural do envelhecimento, as CTHs podem sofrer mutações somáticas, dando origem a uma subpopulação geneticamente distinta de células sanguíneas. Em situações em que novas mutações surgem, há uma propensão à expansão clonal e à transformação leucêmica (Uddin et al. 2021; Pelcovits and Niroula 2020).

A leucemia mieloide aguda (LMA), devido à diversidade de possibilidades genéticas capazes de desencadear sua transformação, é caracterizada como uma doença heterogênea de caráter clonal que afeta os precursores hematopoéticos. Essas alterações impedem que tais células respondam adequadamente a estímulos de diferenciação e apoptose, ao mesmo tempo em que apresentam uma proliferação independente (Pelcovits and Niroula 2020).

Assim como na hematopoese normal, a LMA tem como elemento fundador a célula tronco leucêmica (CTL), responsável pelo estabelecimento e manutenção do *bulk leucêmico* (massa tumoral). Esta massa é composta principalmente por células imaturas que infiltram a medula óssea, órgãos e tecidos, causando os principais sintomas clínicos nos pacientes (Saultz and Garzon 2016; Uddin et al. 2021). Dessa forma, diferenças nos estados transcricionais e epigenéticos, juntamente com a influência do microambiente da medula óssea, podem levar a características

moleculares distintas entre a CTL e o *bulk leucêmico*, impactando diretamente no metabolismo celular (Gronningsaeter et al. 2020).

Ao discutir metabolismo energético, o fenômeno de Warburg, descrito há um século, destaca a capacidade das células tumorais de realizar glicólise anaeróbica, mesmo em condições de oxigênio normais, contribuindo para a produção rápida de energia e intermediários necessários para a proliferação celular descontrolada (Potter et al. 2016). Na LMA, a heterogeneidade metabólica é evidenciada pelos diferentes perfis de metabolismo, seja pela via da fosforilação oxidativa (do inglês, *OXPHOS*) ou pela glicólise, apresentados por diferentes subtipos de células leucêmicas (Gronningsaeter et al. 2020; Raffel et al. 2020).

Por outro lado, o metabolismo *OXPHOS*, uma via metabólica que ocorre nas mitocôndrias, é caracterizado pela produção eficiente de energia em forma de ATP através da oxidação de substratos, como ácidos graxos e piruvato. Estudos como o de Mishra e Chan indicam que um subconjunto de células leucêmicas na LMA pode depender predominantemente do metabolismo *OXPHOS*. Esse grupo de células pode apresentar características específicas, como aumento da biogênese mitocondrial e diminuição da capacidade de reserva (Mishra and Chan, 2016).

A dependência de *OXPHOS* está intrinsicamente ligada à manipulação do DNA mitocondrial (mtDNA), um genoma circular de fita dupla localizado nas mitocôndrias, que desempenha papel crucial na função mitocondrial. A perda de integridade do mtDNA pode resultar em complexos respiratórios disfuncionais, afetando adversamente a produção de ATP (Yan et al. 2019).

A variação no conteúdo de mtDNA (mtDNAc) pode ser uma ferramenta valiosa para identificar abordagens terapêuticas específicas na LMA. Isso porque pacientes com um alto mtDNAc frequentemente apresentam um prognóstico desfavorável,

sendo a mutação FLT3-ITD uma característica associada a um subconjunto distinto de células leucêmicas com características únicas na biologia mitocondrial como observado por Erdem e colaboradores (Erdem et al., 2022). No entanto, em alguns casos de LMA, a depleção de mtDNA pode não afetar a viabilidade celular, podendo indicar a capacidade de reprogramar o metabolismo para uma via glicolítica (Yehudai et al. 2019).

Diante desse cenário, o trabalho visa avaliar o impacto das variações no mtDNAc em células leucêmicas frente ao tratamento com drogas indutoras de apoptose, observando a resposta a terapia em grupos celulares distintos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

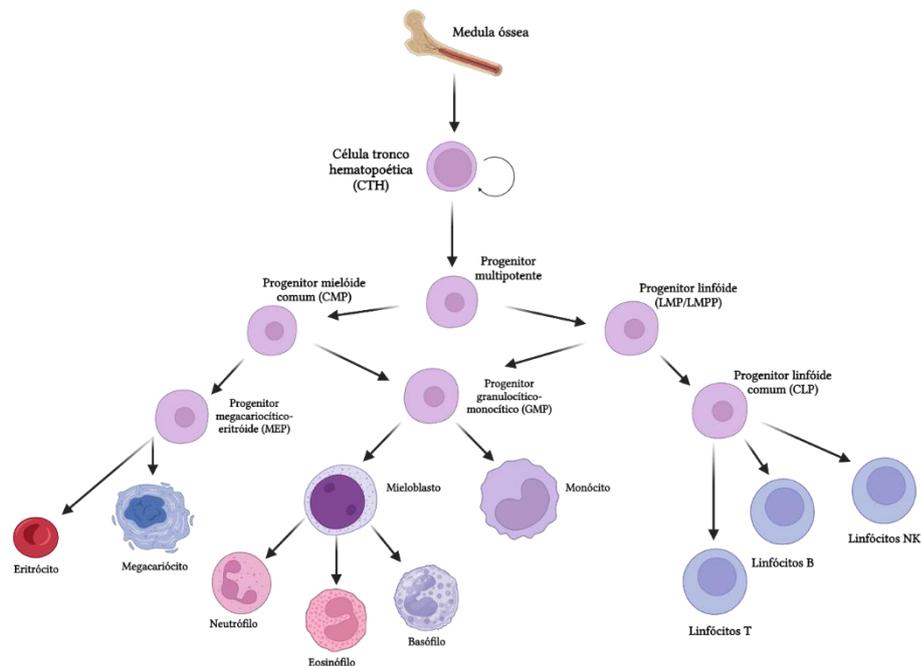
### 2.1 HEMATOPOESE

A hematopoese é definida como um processo dinâmico e vital responsável pela formação dos componentes sanguíneos –eritrócitos, leucócitos e plaquetas- em um indivíduo, gerando aproximadamente 2 milhões de células novas a cada segundo (MacLean et al. 2017). Para que esse intrincado sistema funcione de maneira eficaz, é crucial a atuação de uma célula inicial com capacidade de se diferenciar em qualquer linhagem sanguínea do tecido hematopoético (Eaves 2015).

Nesse contexto, as células tronco hematopoéticas (CTHs) são células raras que se destacam por sua característica fundamental de gerar uma ampla variedade de linhagens distintas, preservando a capacidade de produzir progenitores hematopoéticos multipotentes, desempenhando um papel crucial na manutenção da homeostase e no processo de reparo tecidual. Esse fenômeno é conhecido como autorrenovação ou divisão mitótica assimétrica (Figura 1) (MacLean et al. 2017; Hurwitz et al. 2020).

### Figura 1 - Modelo simplificado hierárquico da hematopoese.

A hematopoese definitiva em um indivíduo adulto ocorre na medula óssea, representando um processo essencial para a formação das células sanguíneas. No ápice da hierarquia estão as células tronco hematopoéticas (CTHs), que possuem a singular capacidade de autorrenovação e de diferenciação em diversas linhagens celulares, sendo a principal fonte para produção de outras células. As CTHs, por sua vez, diferenciam em células progenitoras mais especializadas, mantendo a habilidade de gerar células de uma linhagem específica. Esses progenitores se comprometem com uma direção de desenvolvimento, seguindo as linhagens mieloide e linfóide. O braço mieloide origina uma variedade de células, como granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, megacariócitos e eritrócitos. O braço linfóide dá origem aos linfócitos, fundamentais para a resposta imunológica. Embora esse modelo hierárquico ofereça uma visão simplificada, a hematopoese é um processo notavelmente complexo em relação ao comprometimento de linhagem, sendo regulado por fatores de crescimento, citocinas e interações celulares no microambiente da medula óssea. Qualquer desregulação nesse processo delicado pode resultar em distúrbios hematológicos.



Fonte: Adaptado de Weeks and Ebert, 2023

Por algum tempo, acreditou-se que as células tronco hematopoéticas (CTHs) agiam de forma autônoma, autorregulando seu comportamento. No entanto, compreende-se agora que a heterogeneidade dentro do compartimento progenitor e tronco é influenciada por uma variedade de fatores, tanto extrínsecos quanto intrínsecos (Haas et al. 2018; Wejits et al. 2021).

Um exemplo é que, para ajustar seu comportamento às necessidades do organismo, as CTHs dependem de sinais externos provenientes do microambiente ou nicho celular. Esse ambiente altamente especializado é constituído por células estromais, osteoclastos, osteoblastos, células endoteliais, matriz extracelular, entre outros, que interagem de maneira complexa para criar condições ideais para a produção equilibrada de células sanguíneas na medula óssea (Rowe et al. 2016).

Efeitos específicos no microambiente impactam na autorrenovação, diferenciação ou quiescência da CTH, graças à capacidade do nicho medular de regular a liberação de fatores de crescimento, citocinas e nutrientes. Além disso, fatores intrínsecos, como vias de sinalização, fatores de transcrição e fatores epigenéticos também são cruciais para controlar o tempo das CTHs e o fenótipo dos progenitores (Weijts et al. 2021, Wallace and Obeng, 2023).

Dessa forma, as CTHs quiescentes, que residem nesse microambiente, são protegidas e exibem baixa atividade, mantendo a capacidade de autorrenovação (Nakamura-Ishizu et al. 2020). Contudo, a transição da quiescência para a expansão celular requer alterações drásticas e ativação dos fatores mencionados acima. Logo, fica evidente que os mecanismos que mantêm o equilíbrio entre autorrenovação e a diferenciação são críticos para evitar a exaustão do *pool* de células-tronco e o desenvolvimento de neoplasias hematológicas (Zhang et al. 2021; Belyavsky et al. 2021).

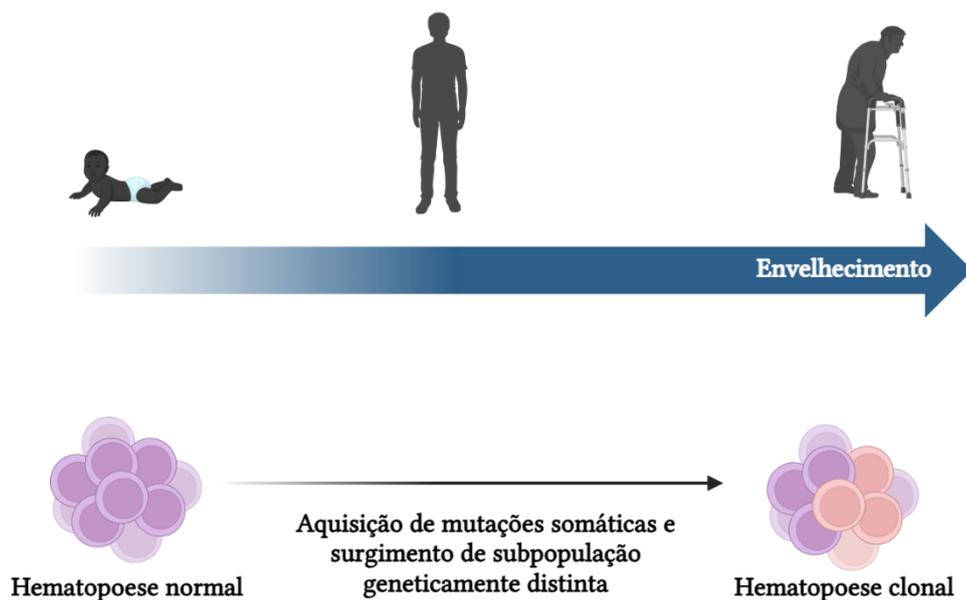
Portanto, o distúrbio no equilíbrio homeostático de reguladores transcricionais da hematopoese é uma das características principais das neoplasias hematológicas. Isso ocorre devido à exposição constante das células ao estresse e também ao processo de envelhecimento, resultando em danos ao DNA e no acúmulo de mutações somáticas durante o processo de diferenciação. Essas mutações afetam

genes envolvidos no ciclo celular, sinalização celular ou fatores de transcrição (Pelcovits and Niroula 2020; Uddin et al. 2021).

Algumas dessas mutações possibilitam o surgimento de uma subpopulação geneticamente distinta com vantagem seletiva, conhecida como hematopoese clonal (Figura 2). Quando novas mutações afetam essas populações que possuem alterações iniciais, perturbando a diferenciação e proliferação celular, pode-se desenvolver a leucemia (Asada and Kitamura, 2021).

**Figura 2 - Aquisição de mutações somáticas desencadeia um processo conhecido como hematopoese clonal.**

À medida que envelhecemos, mutações somáticas podem surgir, levando à formação de uma subpopulação celular com características genéticas únicas, conferindo-lhe superioridade seletiva em relação aos clones convencionais da hematopoese, em um fenômeno denominado hematopoese clonal. Adaptado de Luo et al. 2023.



Fonte: Adaptado de Luo et al., 2023

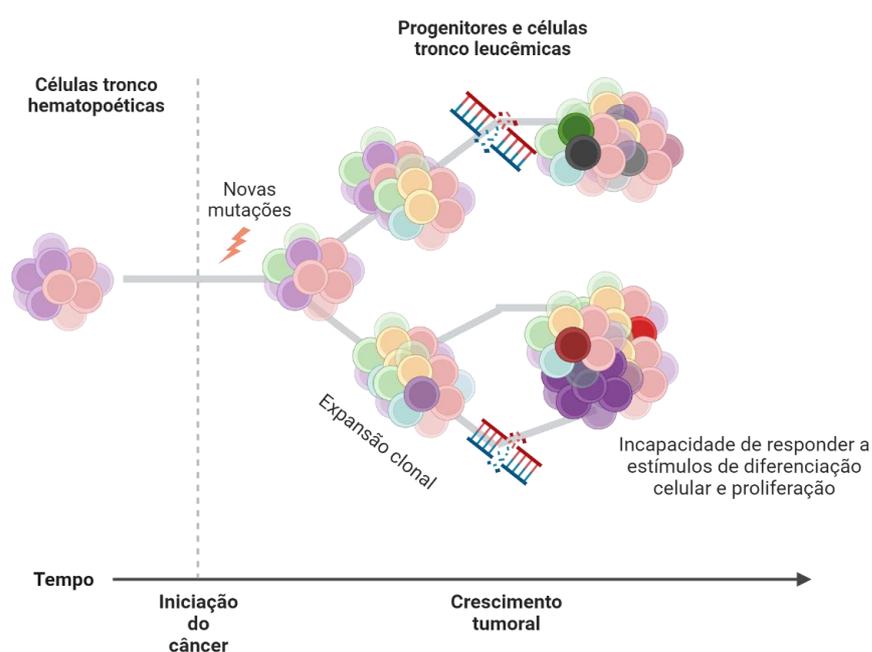
Assim, a leucemia não é uma mera consequência de efeitos transcricionais não específicos, mas sim o resultado final de ataques em pontos vulneráveis no processo da hematopoese (Orkin and Zon, 2008).

## 2.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

A leucemia mieloide aguda (LMA) é caracterizada como um grupo heterogêneo de doenças clonais que afetam os precursores hematopoéticos, tornando-os incapazes de sofrer diferenciação terminal e de responder aos reguladores naturais de proliferação e morte celular (Figura 3). Esse comprometimento da hematopoese resulta na falência da medula óssea (Saultz and Garzon 2016; Pelcovits and Niroula 2020).

### Figura 3 - Processo de transformação leucêmica simplificado.

Células que apresentam mutações somáticas iniciais com vantagem seletiva podem sofrer novas mutações. Isso resulta na expansão clonal, conduzindo à transformação leucêmica. Diferentes clones são gerados devido a mutações adicionais, resultando em uma notável variedade clonal. Essa variedade é responsável por caracterizar a leucemia mieloide aguda (LMA) como um conjunto de doenças heterogêneas, definidas pela incapacidade dos progenitores leucêmicos de responder a estímulos de diferenciação celular e de apresentarem proliferação independente.

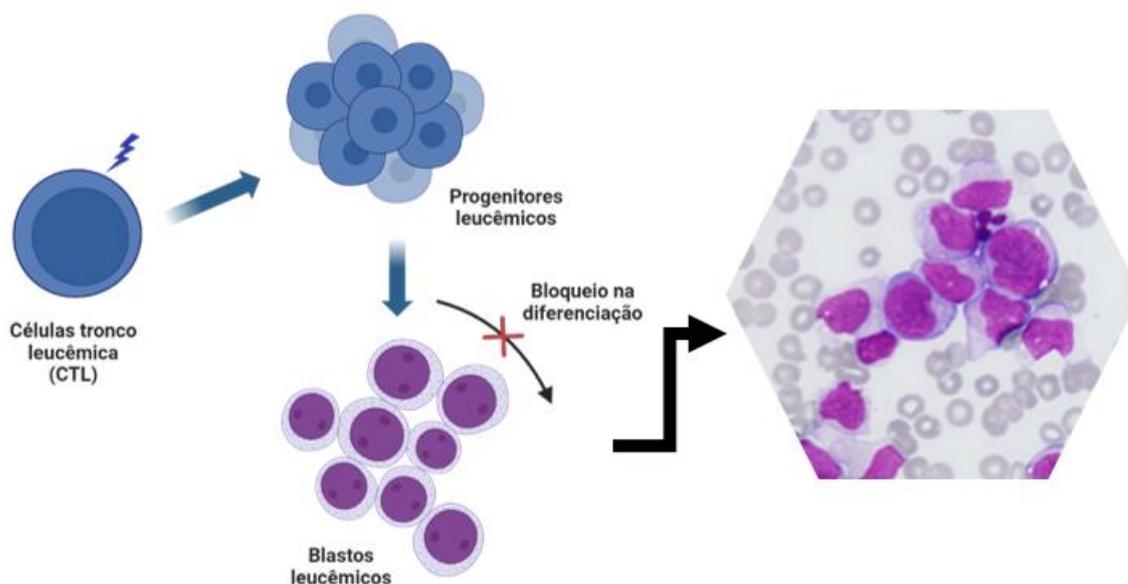


Fonte: Autoria própria gerada através do BioRender

Assim como na hematopoese normal (que possui a CTH como elemento fundamental), a LMA também apresenta um elemento fundador: a célula tronco leucêmica (CTL). A CTL é responsável pelo estabelecimento da doença e manutenção do *bulk leucêmico* (massa tumoral). É essa massa, denominada de blastos, que constitui a fração predominante de células responsáveis pela infiltração da medula óssea, órgãos e tecidos, além de causar os principais sintomas clínicos dos pacientes (Figura 4) (Uddin et al. 2021).

**Figura 4 - Estabelecimento e manutenção do bulk leucêmico.**

A célula tronco leucêmica (CTL) é considerada a fundadora da LMA, apresentando propriedades de célula-tronco, como autorenovação e quiescência. A CTL tem a capacidade de gerar progenitores leucêmicos e manter o *bulk leucêmico* (massa tumoral), constituído pelos blastos. Essas células diferenciadas da LMA não possuem capacidade de autorenovação, mas afetam a biologia do tumor através dos efeitos patológicos. Logo, os blastos podem ser visualizados através da microscopia, sendo responsável pelo diagnóstico inicial da doença e também pelos sintomas clínicos visualizados nos pacientes.



Fonte: Adaptado de Röllig, 2019; Long et al. 2022

A infiltração na medula óssea por blastos leucêmicos é acompanhada por, quase invariavelmente resulta em anemia e trombocitopenia, devido à substituição do tecido hematopoético pelo tecido leucêmico. No exame físico, podem ser observados

sinais como palidez, aumento dos linfonodos e hepatoesplenomegalia devido à infiltração de células blásticas (Estey et al. 2017; Lieveld, 2015).

### 2.2.1 FISIOPATOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

A maioria dos casos de LMA surge *de novo*, sem perturbação clínica primária evidente. Para compreender o processo de leucemogênese, avanços na genômica, desde a citogenética até o sequenciamento de nova geração, têm proporcionado uma compreensão aprofundada da fisiopatologia da LMA (Pasquer et al. 2021).

As primeiras anormalidades genéticas foram identificadas por meio da citogenética convencional, que analisa a estrutura e o número de cromossomos, permitindo a detecção de translocações (t) cromossômicas (Bendari et al. 2020). Essas translocações originam fusões no ponto de quebra dos cromossomos, unindo dois componentes, sendo um geralmente um fator de transcrição/regulador, e o outro com função mais diversificada, frequentemente associada ao controle da sobrevivência celular e apoptose (Prada-Arismendy; Arroyave; Röthlisberger, 2017; Bendari et al. 2020).

Os éxons dos genes envolvidos são justapostos, formando um único gene de fusão, o que resulta na produção de uma proteína híbrida. Esta proteína exibe características únicas e funções aberrantes, que levam à desregulação da transcrição gênica, por meio do recrutamento de fatores, co-ativadores ou co-repressores. Esses elementos, por sua vez, atuam ativando ou inibindo a transcrição, interferindo na diferenciação mieloide (Spiekermann and Shen, 2018).

Nesse contexto, anormalidades citogenéticas são frequentes na LMA, tais como a t(8;21), t(15;17), inv(16), trissomia do cromossomo 8 e deleção total ou parcial dos cromossomos 5 e 7. A família de genes CBF, caracterizada pela t(8;21) e inv(16), origina as fusões gênicas *RUNX1::RUNX1T1* e *CBFB::MYH11*, respectivamente,

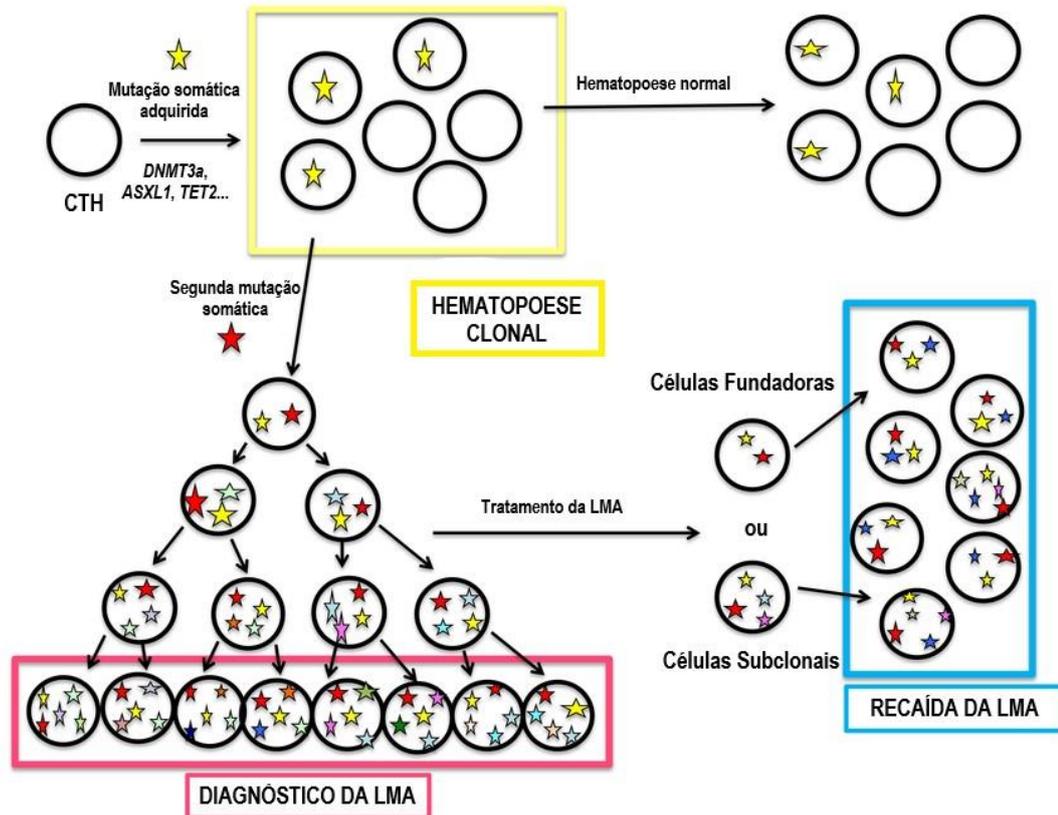
correspondendo a cerca de 15-20% dos casos de LMA *de novo* em adultos jovens (Döhner et al. 2017; Nunes et al. 2019). Já a t(15;17) culmina na formação da proteína de fusão PML::RARA, frequentemente vinculada a um subtipo específico de LMA denominado Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) (Deshpande et al. 2019).

Estudos anteriores sugeriram uma longa fase pré-leucêmica, indicando que a expressão das proteínas de fusão só não é suficiente para o desenvolvimento da leucemia, sendo necessário outros eventos mutagênicos (Shlush et al. 2014). Esse estado pré-leucêmico está diretamente associado a hematopoese clonal mencionada anteriormente, onde células-tronco ou progenitoras adquirem mutações somáticas, mantendo a capacidade de diferenciação (Kantarjian et al. 2021; Pasquer et al. 2021).

Muitas mutações são observadas na hematopoese clonal, sendo as mais frequentes afetando os reguladores epigenéticos *DNMT3A*, *ASXL1* e *TET2* (Figura 5). (Pasquer et al. 2021) A regulação epigenética desempenha papel crítico na hematopoese, modulando a transcrição e expressão gênica sem alterar o código genético, com mutações em genes relacionados à metilação do DNA sendo comuns (Di Nardo and Cortes 2016; Deshpande et al. 2019).

### Figura 5 - Evolução clonal da LMA.

Um exemplo de uma evolução clonal a partir de um estado pré-leucêmico. A CTH sofre mutações somáticas, muitas vezes associado a reguladores epigenéticos. Essas células mantêm a capacidade de diferenciação, mantendo a hematopoese normal. A partir do momento em que novas mutações afetam esses clones, dá-se o diagnóstico da LMA. Essa diversidade clonal é responsável pela dificuldade no tratamento, acarretando muitas vezes na recaída do paciente.



Fonte: Adaptado de Pasquer et al. 2021

Durante muito tempo, a transformação leucêmica foi fundamentada no modelo “two-hit”, que associava mutações de classe I, conferindo propriedades de proliferação independentes, e mutações de classe II, responsáveis pelo bloqueio na diferenciação hematopoética (Greenblatt and Nimer, 2014). Este modelo ganhou suporte com a descoberta de mutações altamente recorrentes nas vias de sinalização de quinases, como *FLT3* (principalmente duplicações internas tandem (ITD)) e *JAK2*, e translocações balanceadas envolvendo fatores de transcrição que definem linhagens (Lindsley and Ebert, 2013; De Kouchkovsky and Abdul-Hay, 2016).

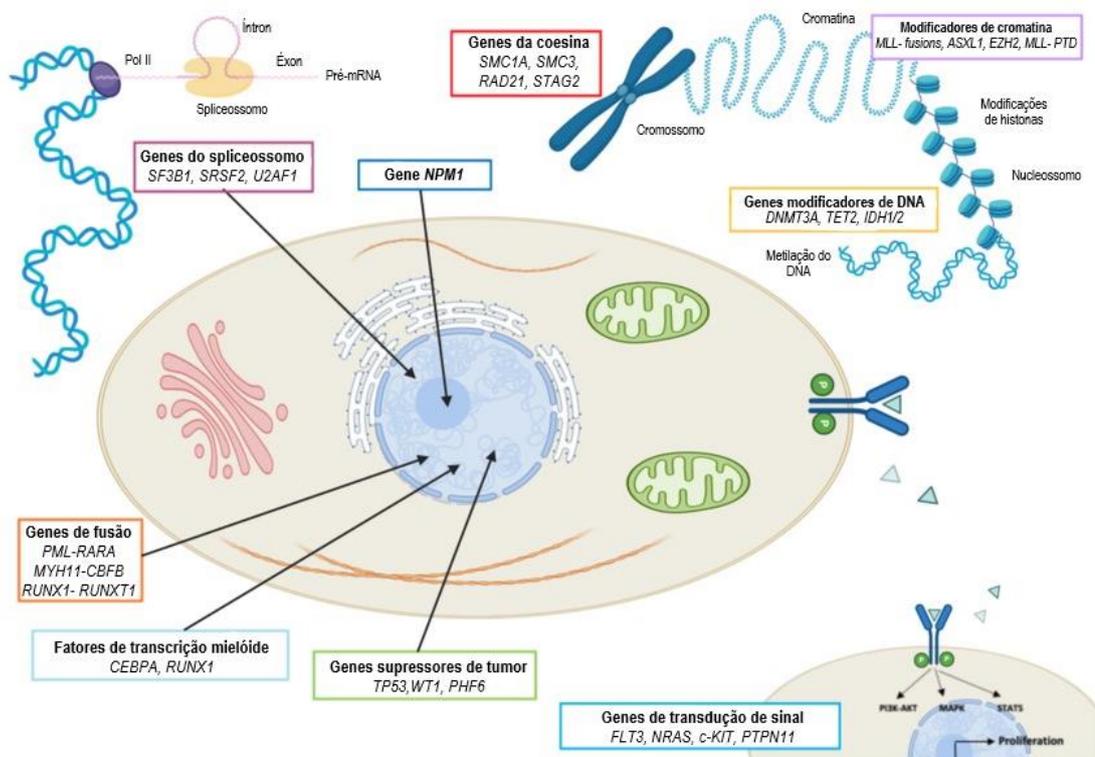
No entanto, diversas outras mutações foram identificadas na LMA, como nos genes *TP53*, *N/K-RAS*, *MLL*, *WT1* e *KIT*. Posteriormente, foram relatadas mutações no gene *CEBPA* e mutações no gene *NPM1*, responsável pela mislocação da proteína NPM1. O avanço tecnológico resultou na invenção da hibridização genômica comparativa (CGH), possibilitando a identificação de aberrações no número de cópias do genoma, como duplicações e deleções, levando à descoberta de mutações no gene *EZH2* (Kantarjian et al. 2021).

Essa extensa heterogeneidade molecular foi evidenciada principalmente com o advento de novas técnicas de sequenciamento como o sequenciamento de nova geração (do inglês *NGS*), tornando o modelo “two-hit” obsoleto. Atualmente, constata-se que haja aproximadamente 17 mutações em células leucêmicas, das quais foi possível identificar mutações *drivers*, responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo leucêmico, e eventos secundários, destacando a intrincada rede de eventos envolvidos na leucemogênese (figura 6) (Boddu et al. 2018).

Foi possível observar então que algumas alterações genômicas são compartilhadas pelo tumor no geral, mas nem todas as células apresentam perfis citogenéticos e genômicos idênticos (Peroni et al. 2023). Em estudos como o de Van Galen et al. 2019 e Potter et al. 2019 foi utilizada a tecnologia de análise de célula única (do inglês, *single-cell*) através do sequenciamento de RNA para decifrar a heterogeneidade clonal presente intra e inter-paciente.

### Figura 6- Categorias funcionais dos genes mutados na LMA.

Os genes de fusão desempenham um papel crucial ao bloquear a diferenciação celular, destacando-se os bem conhecidos *PML::RARA*, *MYH11::CBFB* e *RUNX1::RUNX1T1* associados às translocações t(15;17), inv(16) e t(8;21), respectivamente. Anormalidades nos genes do spliceossomo resultam na síntese de novos pré-mRNAs, como observado nos genes *SF3B1*, *SRSF2* e *U2AF1*. Mutações em *NPM1* são responsáveis pela síntese da proteína nucleolar de chaperonas. Fatores de transcrição mieloides, como *CEPA* e *RUNX1*, desempenham um papel crucial nos processos de diferenciação celular. Genes supressores de tumor, como *TP53*, têm associação direta com diversos tipos de câncer, contribuindo para um prognóstico negativo em pacientes com LMA. O gene *FLT3*, relacionado à transdução de sinal, está diretamente associado à cascata de proliferação celular. Modificações epigenéticas, como alterações em genes modificadores de cromatina e DNA, também desempenham um papel crucial no estado de hematopoese clonal, incluindo exemplos como *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2* e *ASXL1*.



Fonte : Adaptado de Pasquer et al. 2021

Essas análises revelaram uma notável diversidade de células na LMA, indicando a influência significativa do genótipo na determinação da composição celular e da hierarquia tumoral. Cada célula exibe uma composição celular única, caracterizada por programas de diferenciação e hierarquias específicas. Além disso, foram identificadas a arquitetura clonal e uma ordem preferencial de mutação,

reforçando a ideia de complexidade subclonal (Van Galen et al. 2019; Potter et al. 2019).

Logo, devido a heterogeneidade observada na LMA, tornou-se necessário a estratificação da doença de acordo com seu perfil mutacional. O grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) estabeleceu, em 1976, a primeira classificação da LMA de acordo com os aspectos citomorfológicos do clone leucêmico: a classificação FAB. Essa foi a principal categorização da doença durante 25 anos, sofrendo atualizações nos anos 1985 e 1991 (Vigil and Miranda, 2019).

A FAB estratifica a LMA em 8 grupos distintos, os chamados M0 até M7, de acordo com os achados morfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos. A classificação FAB forneceu uma terminologia comum útil, mas foi limitada em significado biológico, prognóstico e terapêutico, sendo substituída logo após as descobertas citogenéticas e moleculares (Kansal, 2016). Então, em 2001, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu uma classificação que introduziu correlações prognósticas importantes. A abordagem de classificação da OMS difere de outras pelo fato de atingir um consenso, incorporando informações genéticas através do algoritmo de diagnóstico (Arber, 2019).

Seguindo o mesmo padrão, foi implementada uma nova classificação da OMS em 2008. Essa estratificação representou a revisão da terceira edição publicada em 2001, ao qual incluiu abordagens integradas da classificação de tumores hematopoiéticos incluindo morfologia, imunofenotipagem, genética e informações clínicas. A atualização incluiu novas alterações de interesse, expandindo o número de entidades com translocações cromossômicas recorrentes e incluiu duas entidades provisórias caracterizadas por mutações genéticas: LMA com *NPM1* citoplasmático/mutado e LMA com mutações *CEBPA* (Estey et al. 2017).

Em 2016, após oito anos de informações e experiências novas que vieram da comunidade científica através de estudos científicos e clínicos, a nova edição da classificação da OMS foi publicada. Essa revisão incorpora novos dados moleculares primários à análise de expressão gênica e do sequenciamento de segunda geração (Leonard; Martin; Roboz, 2017).

Algumas mudanças específicas foram realizadas como a adição da “LMA com *BCR::ABL1*”, afim de guiar a terapia desses pacientes com um inibidor de tirosina quinase, “LMA com mutação *RUNX1*” associada a características clinico-patológicas distintas e resultados inferiores, e além disso, LMA com *NPM1* mutado e LMA com mutações bialélicas do *CEBPA* tornaram-se entidades completas, tendo a última um desfecho favorável (Döhner et al. 2017; Weinberg et al. 2017; Arber, 2019).

Os estudos genômicos recentes sobre neoplasias hematológicas representam um avanço significativo, contribuindo para uma compreensão aprofundada dessas doenças e identificando grupos moleculares distintos. Nesse contexto, em 2022, foi publicada a quinta edição da classificação da OMS para neoplasias mieloides. Paralelamente, um grupo de hematologistas e especialistas clínicos, que estiveram envolvidos nas edições anteriores da OMS, desenvolveu uma outra classificação. Esta nova abordagem concentra-se na integração de dados clínicos, moleculares e citogenéticos, resultando na classificação do consenso internacional de 2022 (ICC, 2022) (Arber et al. 2022).

A ICC 2022 destaca o reconhecimento da LMA com TP53 mutado como entidade separada no grupo de neoplasias mieloides com TP53 mutado, ampliando ainda categorias da OMS para incluir anormalidades genéticas adicionais recorrentes (Tabela 1) (Arber et al. 2022). Notáveis mudanças na classificação da OMS 2022 envolvem a eliminação do termo “LMA não especificada” e a retirada do requisito de

20% de blastos para tipos de LMA com anormalidades genéticas definidas. Essa modificação requer correlação entre achados morfológicos e estudos genéticos para assegurar a ligação direta da anormalidade à patologia (Khoury et al. 2022).

Na classificação OMS 2022, tipos específicos de LMA, como aqueles com BCR::ABL1 e mutação *CEBPa*, exigem pelo menos 20% de blastos no diagnóstico. Ao mesmo tempo, três tipos distintos de LMA com rearranjos envolvendo *KMT2A*, *MECOM* e *NUP98* foram reconhecidos. Além disso, LMA definida por mutações, como LMA com *NPM1* e LMA com *CEBPA*, pode ser diagnosticada independentemente da contagem de blastos (Khoury et al. 2022).

De maneira geral, as maiores mudanças para a quinta edição da OMS e o consenso 2022 (Tabela 1) foram:

1. Alterações no threshold de blastos, incluindo a expansão de anormalidades genéticas que agora podem ser diagnosticadas como LMA com um *cutoff* de blastos de 10%;
2. Introdução de um subtipo de classificação da LMA denominado “translocação recorrente rara”;
3. A ampliação de definições baseadas em mutações (Lee et al. 2023)

Em síntese, a LMA evoluiu de ser considerada uma simples leucemia para uma constelação heterogênea de subentidades com perfis moleculares, clínicos e citogenéticos diversos. Essas características beneficiam-se de terapias seletivas individualizadas, resultando em prognósticos amplos (Kantarjian et al. 2021).

**Tabela 1 - Exemplo da classificação da LMA de acordo com o Consenso Internacional de 2022.**  
O ICC expandiu as categorias que podem diagnosticar LMA com menos do que 20% de blastos para incluir anormalidades genéticas recorrentes.

<b>Classificação da LMA com percentagem de blastos requeridas para diagnóstico</b>
Leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA ≥ 10%
LPA com outros rearranjos RARA* ≥ 10%
LMA com t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 ≥ 10%
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22)/CBFB::MYH11 ≥ 10%
LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A ≥ 10%
LMA com outros rearranjos KMT2A* ≥ 10%
LMA com t(6;9)(q22.3;q34.1)/DEK::NUP214 ≥ 10%
LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2;MELCOM(EVI1) ≥ 10%
LMA com outros rearranjos MECOM ≥ 10%
LMA com outras translocações raras recorrentes ≥ 10%
LMA com t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 ≥ 20%
LMA com NPM1 mutado ≥ 10%
LMA com mutação CEBPA in-frame bZIP ≥ 10%
LMA e SMD/LMA com TP53 mutado 10-19% (SMD/LMA) e ≥20% (LMA)
LMA e SMD/LMA com mutações em genes relacionados a mielodisplasia 10-19% (SMD/LMA) e ≥ 20% (LMA)
Definida por mutações em ASZL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 OU ZRSR2
LMA com anormalidades citogenéticas relacionadas a mielodisplasia 10-19% (SMD/LMA) e ≥ 20% (LMA)
Definida por detectar um cariótipo complexo (≥ 3 anormalidades cromossomais clonais não relacionadas na ausência de outras anormalidades recorrentes), anormalidades clonais del(5q/t5q/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) ou del(17p)m del(20q), e/ou idic(X)(q13)
LMA não especificada (NOS) 10-19% (SMD/LMA) e ≥ 20% (LMA)
Sarcoma mioelóide

Fonte: Adaptado de Arber et al. 2022

### 2.2.2 A ALTA HETEROGENEIDADE CELULAR ACARRETA EM HETEROGENEIDADE METABÓLICA

O metabolismo energético representa uma intrincada rede de processos que asseguram a produção de energia conforme as exigências celulares, sofrendo influência dos estágios de proliferação, diferenciação e quiescência celular. Esta sucessão de eventos culmina na síntese de adenosina trifosfato (ATP) por meio do processo de respiração celular, compreendendo a glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico (do inglês, *TCA – tricarboxylic acid cycle*) e fosforilação oxidativa (do inglês, *OXPHOS- oxidative phosphorylation*) na mitocôndria (Judge and Dodd, 2020). Essa orquestração metabólica desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento e reprodução celular, proporcionando os nutrientes necessários para a manutenção da homeostase (Cassim and Pouyssegur, 2020).

Na etapa inicial da glicólise, a glicose sofre uma sequência de transformações culminando na formação do metabólito final piruvato, gerando ao longo desse processo duas moléculas de ATP. O piruvato, por sua vez, pode adentrar o ciclo do ácido tricarboxílico (*TCA*) localizado na mitocôndria, intensificando a produção de energia por meio da fosforilação mitocondrial. Em situações de hipóxia, por outro lado, o piruvato pode ser convertido a lactato por meio da glicólise anaeróbica (Herst et al. 2011). O ciclo do *TCA*, desempenhando um papel central na captação de carreadores de elétrons, como o NADH e o FAH<sub>2</sub>, contribui significativamente para a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Giampazolias and Tait, 2016; Rashkovan and Ferrando, 2019).

A fase final da respiração celular, *OXPHOS*, utiliza os carreadores gerados pelo *TCA* para produzir quantidades significativas de ATP. Apesar de ser crucial para o fornecimento de energia celular, *OXPHOS* também é responsável pela geração de

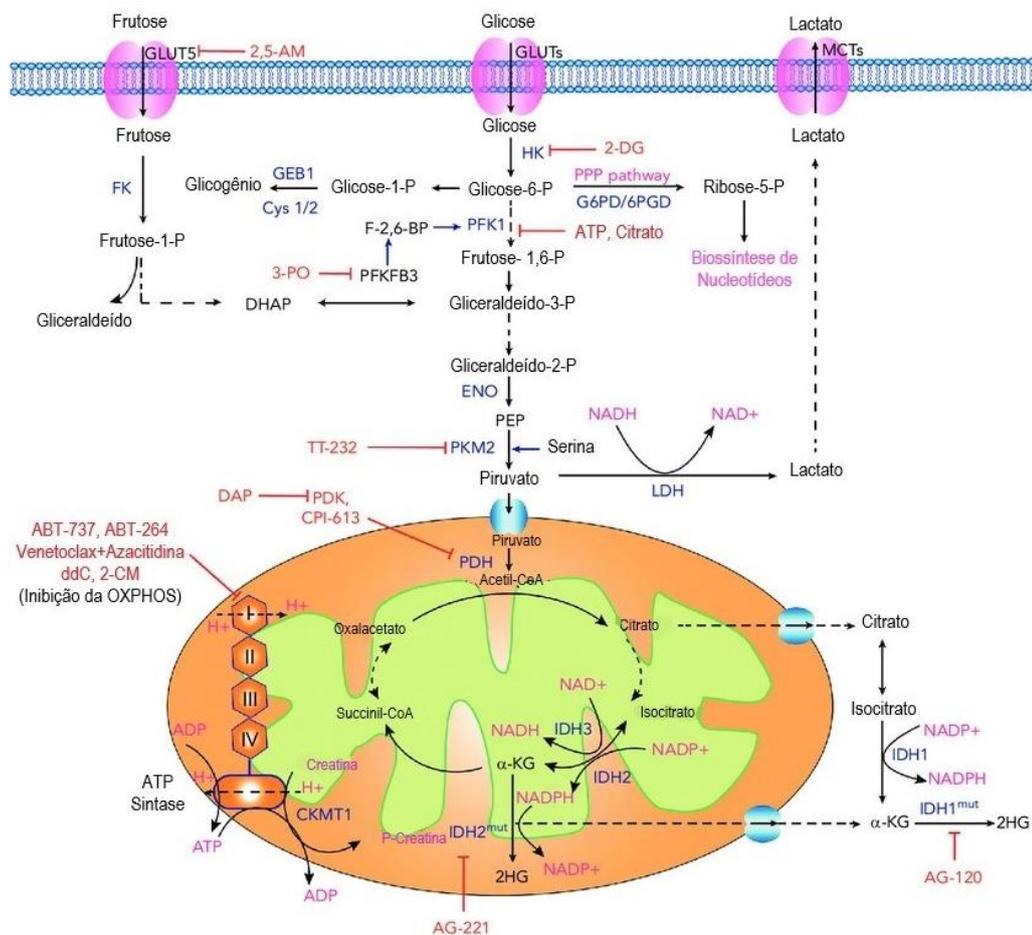
espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando assim o estresse oxidativo (Mishra and Chan, 2016). Enquanto células normais mantêm um equilíbrio entre o suprimento e a demanda metabólica, células cancerígenas apresentam metabolismos distintos, adaptando-se para crescimento e sobrevivência (figura 7) (Evans and Neuman, 2016; Presti et al. 2021).

Assim, no cenário neoplásico, a reprogramação metabólica emerge como um dos marcadores distintivos do câncer. Desbravado há um século, o efeito Warburg figura como uma das características metabólicas mais sólidas nos tumores malignos, caracterizando a propensão das células tumorais a metabolizarem glicólise anaerobicamente, mesmo na presença de oxigênio (Potter et al. 2016). Este processo, embora resulte em baixa produção de ATP, gera precursores anabólicos (nucleotídeos, aminoácidos, lipídeos) fundamentais para a tumorigênese. Além disso, promove um crescimento tumoral acelerado, áreas de hipóxia com baixos níveis de glicose e elevadas concentrações de lactato (Liberti and Locasale, 2016).

Contudo, mesmo diante da preferência pelo metabolismo glicolítico, algumas células cancerígenas escolhem reprogramar sua rota metabólica conforme as exigências. Certos tumores sólidos, a exemplo de melanomas, revelam assinaturas metabólicas mais vinculadas à respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (*OXPPOS*), ao passo que outros, como adenocarcinomas de cólon, tendem a se inclinar para a glicólise (Bohn et al. 2018).

### Figura 7 - Metabolismo energético.

A glicose é a etapa inicial da respiração celular, responsável por gerar 2 moléculas de ATP e o produto final piruvato. Nota-se que no decorrer da glicólise, metabólitos intermediários são importantes para outras vias, como a via da pentose fosfato (PPP) para biossíntese de nucleotídeos. Além disso, a glicólise reduz  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ . Os equivalentes redutores podem ser usados para reduzir o piruvato a lactato através da LDH (lactato desidrogenase). O piruvato pode adentrar a mitocôndria através de um carreador de piruvato mitocondrial e ser convertido a Acetil-CoA. A partir deste processo, o ciclo do ácido tricarboxílico se inicia, levando então a geração de metabólitos como citrato,  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), succinato e fumarato. O ciclo é também responsável pela produção de elétrons para a cadeia transportadora, onde se inicia então a fosforilação oxidativa. O complexo I da cadeia transportadora transfere elétrons aos outros complexos. A energia liberada é usada para criar um gradiente eletroquímico membranar, usado para condensar ADP com fosfato inorgânico através da ATP sintase. Em adição a fosforilação oxidativa, a mitocôndria gera espécies reativas de oxigênio e controla os níveis redox da célula, modulando o cálcio citosólico e regulando a via intrínseca da apoptose. Alguns inibidores conseguem atingir a via fosforilativa, sendo o venetoclax um fármaco importante para o tratamento da LMA. Há também o 2,3-ddC, análogo utilizado em fase de ensaios *in vitro* para a redução do DNA mitocondrial.



Fonte: Adaptado de Mishra; Millman; Zhang, 2023

Assim, no cenário neoplásico, a reprogramação metabólica emerge como um dos marcadores distintivos do câncer. Desbravado há um século, o efeito Warburg figura como uma das características metabólicas mais sólidas nos tumores malignos, caracterizando a propensão das células tumorais a metabolizarem glicólise anaerobicamente, mesmo na presença de oxigênio (Potter et al. 2016). Este processo, embora resulte em baixa produção de ATP, gera precursores anabólicos (nucleotídeos, aminoácidos, lipídeos) fundamentais para a tumorigênese. Além disso, promove um crescimento tumoral acelerado, áreas de hipóxia com baixos níveis de glicose e elevadas concentrações de lactato (Liberti and Locasale, 2016).

Contudo, mesmo diante da preferência pelo metabolismo glicolítico, algumas células cancerígenas escolhem reprogramar sua rota metabólica conforme as exigências. Certos tumores sólidos, a exemplo de melanomas, revelam assinaturas metabólicas mais vinculadas à respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (*OXPHOS*), ao passo que outros, como adenocarcinomas de cólon, tendem a se inclinar para a glicólise (Bohn et al. 2018).

Essa heterogeneidade também é observada na LMA, onde as diferenças nos estados transcricionais e epigenéticos, além da influência do microambiente da medula óssea, podem levar a características moleculares distintas entre a célula tronco leucêmica (CTL) e o *bulk leucêmico*, o que impacta diretamente no metabolismo energético. Logo, observa-se uma notável diversidade celular, resultando em amplo espectro metabólico, muitas vezes baseada nas anormalidades genéticas presentes no clone leucêmico (Gronningsaeter et al. 2020).

Essa variação nos programas metabólicos normalmente resulta em um aumento da atividade mitocondrial, acarretando em elevada biogênese mitocondrial, redução na capacidade de reserva adicional e maior dependência de *OXPHOS* em

comparação com células progenitoras hematopoéticas normais. Ao relacionar com dados mutacionais do clone, em estudos como os de Erdem e colaboradores e de Stuani e colaboradores, foram observados que mutações em *FLT3-ITD* e *IDH1/2*, por exemplo, levam ao aumento da massa mitocondrial e da atividade fosforilativa, visando uma maior produção de energia (Stuani et al. 2021; Erdem et al. 2022).

Portanto, a diversidade metabólica pode intensificar a agressividade da LMA, conferindo às células a habilidade de sobreviver em meio a demandas metabólicas elevadas (Gronnigsaeter et al. 2020). Esse processo pode impactar a eficácia do tratamento da doença, tornando-a desafiadora devido à heterogeneidade de clones no paciente. Um exemplo, apresentado por Gastel et al. destaca que as células leucêmicas residuais durante o tratamento manifestam uma adaptação metabólica transitória, resultando em resistência à quimioterapia (Gastel et al. 2020).

Sugere-se que a terapia induz uma transição para vias metabólicas alternativas, alimentando *OXPHOS* e resultando em resistência aos tratamentos convencionais. Assim, o desenvolvimento de estratégias de tratamento que visam essas vias torna-se crucial para erradicar populações refratárias de células leucêmicas (Mishra; Millman; Zhang, 2023).

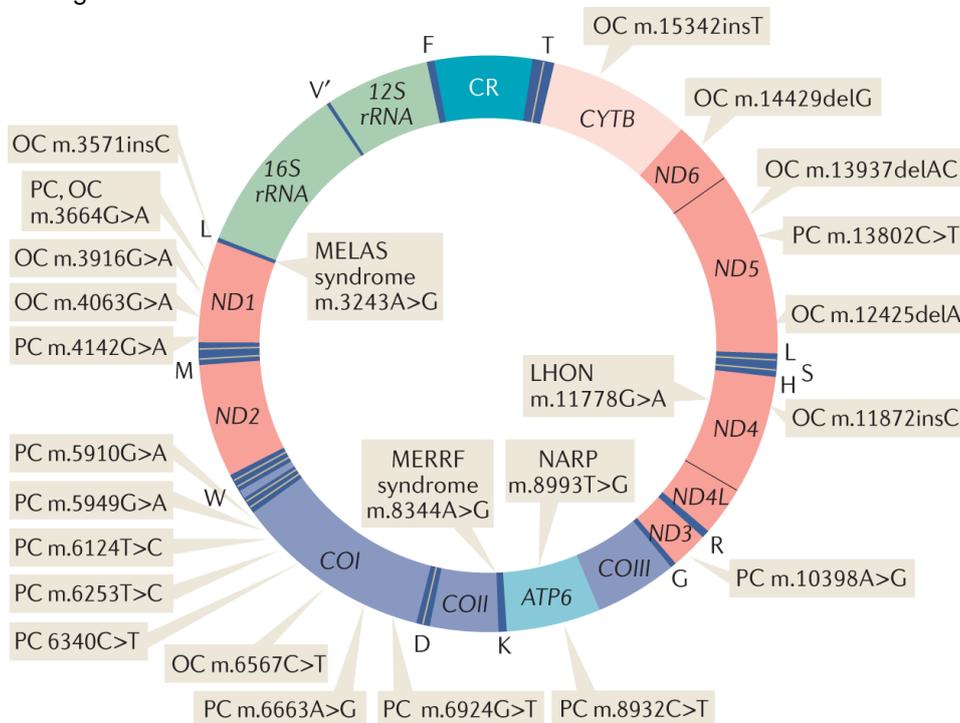
A dependência de *OXPHOS* está intrinsicamente relacionada à manipulação do DNA mitocondrial (mtDNA), um genoma circular de fita dupla localizado nas mitocôndrias, desempenhando um papel crucial na função mitocondrial (Yan et al. 2019). Direcionar a biossíntese do DNA mitocondrial (mtDNA) surge como uma oportunidade terapêutica promissora para pacientes com LMA (P. Sharma and Sampath, 2019).

### 2.2.3 DNA MITOCONDRIAL

Células eucarióticas possuem dois genomas distintos: o DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA), localizado no interior das mitocôndrias. O mtDNA é um genoma circular de fita dupla com 16,6 Kb (quilobases) que codifica 13 das 90 proteínas envolvidas na cadeia respiratória mitocondrial (figura 8). Ao contrário do nDNA, que se replica uma vez durante a divisão celular, o mtDNA é continuamente replicado de forma independente do ciclo celular. Em humanos, a polimerase gama (POLG) codificada no núcleo é a única responsável por essa replicação (Sharma, Pasala, Prakash 2019; Yan et al. 2019).

#### Figura 8 - Estrutura do DNA mitocondrial e suas variantes.

O DNA mitocondrial codifica sete subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6) das 45 que compõem o complexo I, uma subunidade (CYTB) das 13 do complexo III e duas subunidades (ATP6 e ATP8) das 18 do complexo V. É possível observar algumas variantes. Estas apresentam critérios para serem consideradas potencialmente patogênicas, sendo, além disso, raras na população, sem recorrência significativa.



Fonte: Kopinski et al., 2021

A perda de integridade do mtDNA resulta na disfunção dos complexos respiratórios, impactando negativamente na produção de ATP, uma vez que muitas proteínas dos complexos da cadeia transportadora de elétrons são codificadas pelo mtDNA. Em tumores sólidos, onde o mtDNA foi principalmente estudado, foram descritas duas principais alterações- a primeira refere-se à presença de mutações no mtDNA e a segunda trata de alterações no conteúdo do mtDNA (Kopinski et al. 2021).

Em uma publicação recente de Gorelick et al, foi evidenciado que mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) podem ocorrer com a mesma frequência observada no DNA nuclear das células tumorais. A LMA destaca-se como o tumor com a menor carga mutacional de mtDNA entre os diversos tipos de tumores avaliados (Gorelick et al. 2021). Ao empregar a metodologia desses pesquisadores para investigar se mutações no mtDNA na LMA podem antecipar resposta clínica, Martins e colaboradores conduziram uma análise que revelou a falta de associação entre mutações no mtDNA e os desfechos clínicos. Essa conclusão foi obtida tanto ao considerar as mutações de forma conjunta quanto ao avaliá-las de maneira isolada (Dados do grupo ainda não publicados).

A segunda modificação refere-se ao conteúdo do mtDNA. O equilíbrio entre a síntese e a degradação do mtDNA determina o número de cópias, variando de  $10^3$  a  $10^4$  cópias em diferentes tipos celulares. Especificamente, disfunções na distribuição do mtDNA foram associadas a várias doenças humanas, devido à conexão entre alterações qualitativas e quantitativas do mtDNA e características clínicas como ataxia, baixa estatura, cardiomiopatia e mudanças metabólicas (Foote et al. 2018). O teor do mtDNA pode ser modulado conforme as condições fisiológicas das células, o que, por sua vez, repercute em alterações funcionais nas mitocôndrias, podendo resultar no aumento ou diminuição das cópias de mtDNA (Mi et al. 2015).

O conteúdo de mtDNA (mtDNAc) tem sido objeto de estudo em diversos tipos de neoplasias. Tanto o aumento quanto a diminuição no número de cópias foram previamente relatados como associados aos riscos de câncer. Por exemplo, a redução no mtDNAc foi observada no câncer gástrico em processo ulcerativo, correlacionando-se com uma menor sobrevida (Correia et al. 2011; Guerra et al. 2017). Algumas pesquisas justificam essa diminuição de mtDNA com a perda de função da polimerase gama (POLG), resultando em um aumento de espécies reativas devido a uma diminuição geral da função mitocondrial. Esse cenário cria um ambiente propício para a aquisição de mutações. Por outro lado, outras pesquisas argumentam que o aumento no número de cópias ocorre devido ao aumento de danos no reparo do mtDNA, resultando em uma maior formação de fragmentos de fita (Correia et al. 2011; Guerra et al. 2017).

No contexto das neoplasias hematológicas, estudos prospectivos revelaram uma associação entre o aumento do número de cópias de mtDNA no sangue periférico e o aumento do risco de Linfomas não Hodgkin de células B (Hosnijeh et al., 2014). Evidências adicionais indicam que blastos leucêmicos apresentam um aumento na massa mitocondrial quando comparados aos seus equivalentes normais, o que possui implicações clínicas significativas para o paciente, como observado por Moschoi e colaboradores. Funcionalmente, células estromais da medula óssea transferem mitocôndrias saudáveis e funcionais para os blastos leucêmicos, conferindo-lhes uma vantagem de sobrevivência (Moschoi et al., 2016).

Na Leucemia Mieloide Aguda (LMA), um estudo conduzido por Yehudai e colaboradores investigou os efeitos da inibição da polimerase gama (POLG) pelo fármaco Alovudina. Este medicamento, um antirretroviral utilizado no tratamento do HIV, demonstrou reduzir o conteúdo de DNA mitocondrial (mtDNA), resultando em

uma diminuição da viabilidade celular. No entanto, de forma curiosa, em algumas células, a depleção do mtDNA não teve impacto na viabilidade celular, levantando a questão central abordada nesse projeto: em que medida o conteúdo de mtDNA (mtDNAc) em amostras de LMA pode ser considerado um marcador confiável de resultados clínicos (Yehudai et al., 2018).

Recentemente, Martins e colaboradores publicaram um estudo sobre o conteúdo de DNA mitocondrial (mtDNAc) em pacientes com um subtipo específico de Leucemia Mieloide Aguda: a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA). Foram utilizadas amostras de 156 pacientes tratados com ácido all-trans retinoico (ATRA) e quimioterapia, comparando o mtDNAc entre amostras saudáveis e pacientes com LPA. Notavelmente, os pacientes com LPA apresentaram um aumento significativo no mtDNAc em comparação com os indivíduos saudáveis. Entretanto, ao avaliar o impacto clínico dessa variação no número de cópias, constatou-se que os pacientes com mtDNAc superior ao normal apresentaram melhores desfechos clínicos (Martins et al., 2022).

Curiosamente, o efeito foi o oposto na LMA não-LPA. Em estudo conduzido por Lima e colaboradores, observou-se que o mtDNAc era mais abundante em pacientes com LMA em comparação com células mononucleares saudáveis ou células CD34+ saudáveis, o que estava associado a um prognóstico negativo. Isso porque ao dividir os pacientes de acordo com o conteúdo de mtDNA, observou-se que aqueles com alto mtDNAc apresentaram pior sobrevida livre de doença, resultando em um aumento na incidência cumulativa de recaída. Esses achados também foram associados à estratificação de risco genético, mostrando que o mtDNA foi capaz de melhorar a avaliação de risco em todos os grupos (dados ainda não publicados).

Portanto, como mencionado anteriormente, a concepção de estratégias terapêuticas voltadas para a regulação da biossíntese do DNA mitocondrial (mtDNA) emerge como uma perspectiva promissora para um grupo específico de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (Mishra; Millman; Zhang, 2023).

#### **2.2.4 FATORES PROGNÓSTICOS E TRATAMENTO NA LMA**

Ao estratificar os pacientes de acordo com seu risco de resistência a um determinado tratamento, os fatores prognósticos auxiliam o médico na escolha da terapia. São, em geral, subdivididos em (I) fatores relacionados ao paciente e suas condições de vida e (II) aqueles relacionados as características genéticas da LMA (Liersch et al. 2014).

A idade no momento do diagnóstico é o fator prognóstico mais forte relacionado ao paciente. Idosos, com mais de 60 anos, tendem a apresentar mais frequentemente anormalidades cromossômicas desfavoráveis, o que pode tornar o tratamento com esquemas de quimioterapia mais agressivos. Outro fator preditivo relacionado ao paciente é o status de desempenho, avaliado tradicionalmente pelo ECOG (Grupo de Oncologia Cooperativa Oriental), utilizado pelos hematologistas para avaliar o impacto da doença / tratamento na capacidade do paciente idoso de cuidar de si e de realizar atividades diárias. Quando o status é superior a 2, o prognóstico é considerado desfavorável independentemente da idade (De Kouchkovsky; Abdul-hay, 2016; Estey et al. 2017).

A idade e o status de performance são fatores preditivos para avaliar os riscos de mortalidade relacionada ao tratamento. Associadas a esses dois fatores, as alterações citogenéticas e moleculares, relacionadas às características genéticas da LMA, permanecem como as variáveis mais importantes para predição da LMA. Os

riscos citogenéticos são os fatores prognósticos mais fortes para remissão completa e sobrevida global na doença (De Kouchkovsky; Abdul-hay, 2016; Nunes et al. 2019).

Em 2010, o esquema de classificação do European Leukemia Net (ELN) foi criado como o objetivo de padronizar a estratificação de risco em pacientes adultos com LMA, incorporando informações citogenética e anormalidades moleculares conhecidas. Inicialmente, os pacientes eram agrupados em quatro categorias de risco: favorável, intermediário 1, intermediário 2 e adverso. A distinção entre intermediário I e intermediário II era baseada nas características genéticas em vez de considerações prognósticas (Medinger; Lengerke; Passweg, 2016). Em 2017 e mais atualmente em 2022, essa classificação foi revisada, sendo então dividida em três grupos: favorável, intermediário e adverso; com inclusão de mudanças baseadas no status mutacional de alguns genes. Os pacientes classificados como favoráveis pela ELN tendem a apresentar maior sobrevida e menor incidência de recidiva em comparação com aqueles classificados como intermediários ou adversos (Estey, 2018).

Para os pacientes do grupo de risco intermediário, a terapia convencional tem sido amplamente utilizada, porém para alguns deles foram observados resultados insatisfatórios. O transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (TCTH) é uma opção atrativa para aqueles pacientes do grupo intermediário que apresentam altas chances de recaída, em particular para os que apresentam a mutação FTL3-ITD (Röllig, 2019; Short; Ravandi, 2016). Por outro lado, para os pacientes do grupo de risco adverso, é considerado que o tratamento de escolha para a terapia pós-remissão deva ser o TCTH, visto que não há chance de recuperação através da quimioterapia devido a agressividade do prognóstico (Keiffer; Palmisiano, 2019; Short; Ravandi, 2016).

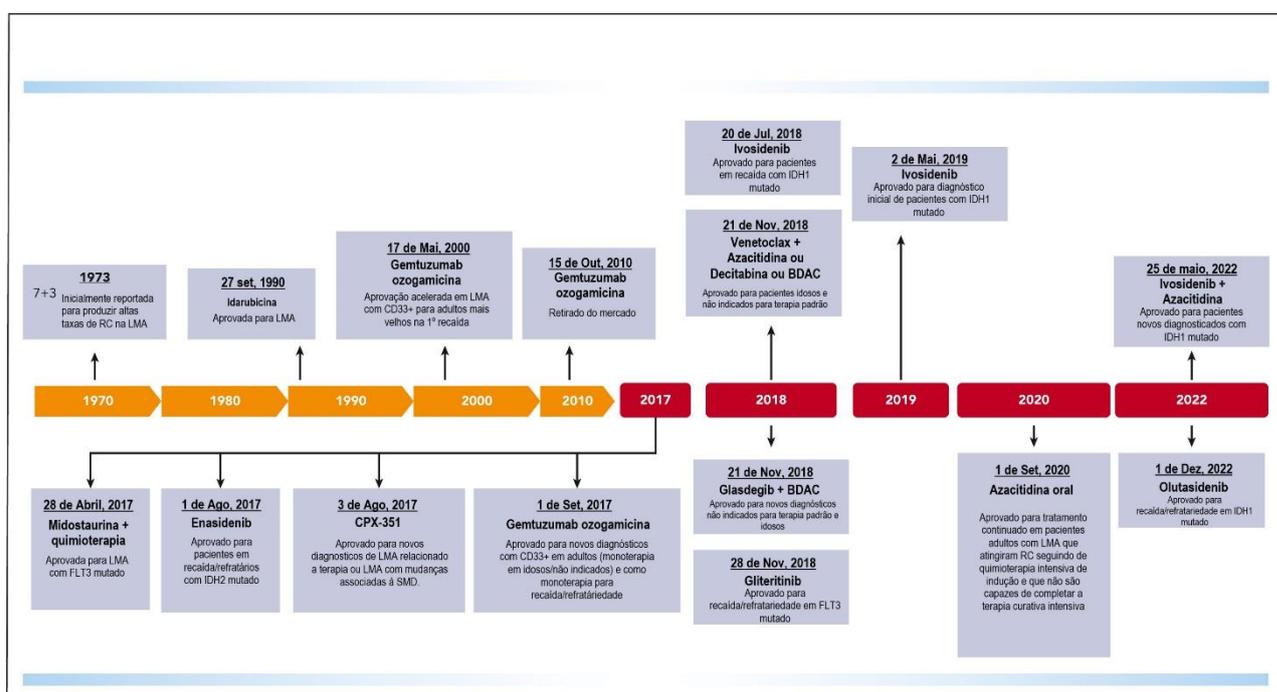
A terapia padrão para pacientes recém-diagnosticados foi desenvolvida na década de 70. Essa abordagem terapêutica envolve um protocolo conhecido como "3+7", no qual uma antraciclina (daunorrubicina ou idarubicina por 3 dias) é combinada com um análogo de nucleosídeo chamado citarabina (AraC), administrado por infusão contínua ao longo de 7 dias. Essa fase é denominada terapia de indução, com o objetivo de alcançar a remissão morfológica completa e restaurar a hematopoese normal (Carter et al., 2020).

Caso o paciente responda positivamente ao tratamento, a próxima etapa envolve ciclos repetitivos de doses intermediárias de AraC e/ou transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TCTH), com o intuito de maximizar a probabilidade de remissão. Esse processo é denominado terapia de consolidação, que resulta em remissão completa em 60-80% dos pacientes mais jovens (<60 anos) e em 40-60% dos indivíduos mais velhos (>60 anos) (Bazinet e Assouline, 2021).

Embora o TCTH permaneça como a opção de terapia curativa, novas alternativas de tratamento estão sendo avaliadas como acréscimo ao repertório terapêutico, especialmente para pacientes de alto risco (Lachowiez; DiNardo; Sanam, 2023). Essa consideração se deve à grande dificuldade de identificação de doadores compatíveis, ao alto custo do tratamento e aos pacientes que se tornam inelegíveis a terapia devido ao status de desempenho, resultando em baixa tolerância e limitando a viabilidade da quimioterapia intensiva e do transplante (Choi; Shukla; Abdul-Hay, 2023). Assim, o panorama do tratamento da LMA sofreu mudanças significativas com a aprovação de novos fármacos pela FDA (*Food and Drug administration*) (Figura 9) (Liu 2021).

### Figura 9 - Linha do tempo de fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento da LMA.

Desde a década de 70, com o desenvolvimento da terapia padrão 3+7, novas opções de tratamento emergiram com o intuito de atender pacientes com mutações específicas, idosos e inelegíveis a terapia de alta intensidade. Na década de 90, a idarubicina, agente antimitótico, foi aprovada para LMA. Nos anos 2000, gemtuzumab ozogamicina foi aprovado com intuito de tratar pacientes CD33+, porém foi retirado do mercado em 2010, retornando em 2017 indicado para idosos e monoterapia na recaída. Em 2017, midostaurina e enasidenib foram aprovados para o tratamento em *FLT3* e *IDH2* mutado, respectivamente, além do CPX-351 para LMA relacionada a terapia e LMA secundária. Em 2018, lvsosidenib foi aprovado para pacientes em recaída com mutação de *IDH1*, tendo extensão para pacientes com diagnóstico inicial em 2019. Venetoclax com azacitidina ou decitabina ou baixas doses de AraC (BDAC) foi aprovado também em 2018 para pacientes idosos e não indicados para terapia padrão. Outros fármacos para terapia com *FLT3* mutado e *IDH1* seguiram aprovados até o ano de 2022.



Fonte: Adaptado de Chaer; Hourigan; Zeidan., 2023

Conforme discutido anteriormente, a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) abrange diversos subtipos, cada qual com prognósticos e características distintas. Portanto, mesmo diante da taxa de remissão completa alcançada com a terapia padrão, é comum a recaída da doença, representando um prognóstico desfavorável para muitos pacientes, especialmente nos primeiros 18 meses após o início do tratamento. Tal recorrência é atribuída à heterogeneidade mutacional da doença, o que dificulta a implementação de uma abordagem de monoterapia eficaz (Di Nardo e Cortes, 2016; Yilmaz et al., 2019).

Diante disso, essas novas terapias englobam: protocolos modernos de quimioterapia intensiva destinados a pacientes mais jovens (bem como a idosos que se enquadram nessa categoria) e esquemas de baixa intensidade direcionados a pacientes mais velhos ou àqueles que não se adequam à terapia padrão (H. M. Kantarjian, 2021).

Transições relevantes recentes na prática clínica incluem, por exemplo, moléculas inibidoras de *FLT3* – inibidor de tirosina quinase *fms-like* (como midostaurina e gilteritinib) e *IDH* – isocitrato desidrogenase. A aprovação desses inibidores melhorou as taxas de resposta em pacientes que apresentam mutações em *FLT3* e *IDH1/2* (Bazinet & Assouline 2021). Outro exemplo é o gemtuzumabe ozogamicina, um conjugado fármaco-anticorpo aprovado em 2000, que utiliza anti-CD33 para entregar a caliqueamicina (um antibiótico citotóxico), e causar danos ao DNA de fita dupla (Short et al. 2020).

A desregulação epigenética também é frequentemente observada na LMA; o uso de agentes hipometilantes tem desempenhado um papel crucial no tratamento, especialmente para pacientes que não são elegíveis para a quimioterapia padrão (Deshpande et al. 2019). A azacitidina e a decitabina são dois análogos de nucleosídeos semelhantes, e, embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente esclarecido, acredita-se que exerçam um efeito antileucêmico por meio da inibição das DNA metiltransferases. Isso resulta na hipometilação do DNA, promovendo a reativação de genes supressores de tumor e a melhoria da diferenciação celular (Cai & Levine 2019).

O aprimoramento no entendimento da importância da maquinaria apoptótica na resistência à quimioterapia e na propagação da Leucemia Mieloide Aguda (LMA) também resultou no desenvolvimento de terapias indutoras de apoptose, que parecem

ser eficazes independentemente da presença ou ausência de mutações-alvo (Jonas and Pollyea, 2019). A expressão de BCL-2 na LMA tem sido associada à baixa sensibilidade à quimioterapia citotóxica e altas taxas de recidiva (Liu, 2021). Portanto, em pacientes com 60 anos de idade ou mais, que não são candidatos à terapia de indução/remissão, o Venetoclax, um inibidor seletivo de BCL-2 responsável por promover a via intrínseca apoptótica, juntamente com um agente hipometilante ou baixas doses de AraC, emergiu como uma opção de tratamento eficaz, com base na alta taxa de resposta (Garciaz et al., 2021).

Estudos de fase 3 recentemente publicados validaram os benefícios de sobrevida associados à azacitidina em combinação com venetoclax, em comparação com azacitidina e placebo. As remissões duradouras alcançadas em alguns pacientes mais velhos que utilizam o venetoclax com azacitidina podem, ao menos em parte, ser explicadas pela interrupção do metabolismo energético que ocorre nas células leucêmicas em resposta à combinação de fármacos (Daver et al., 2020).

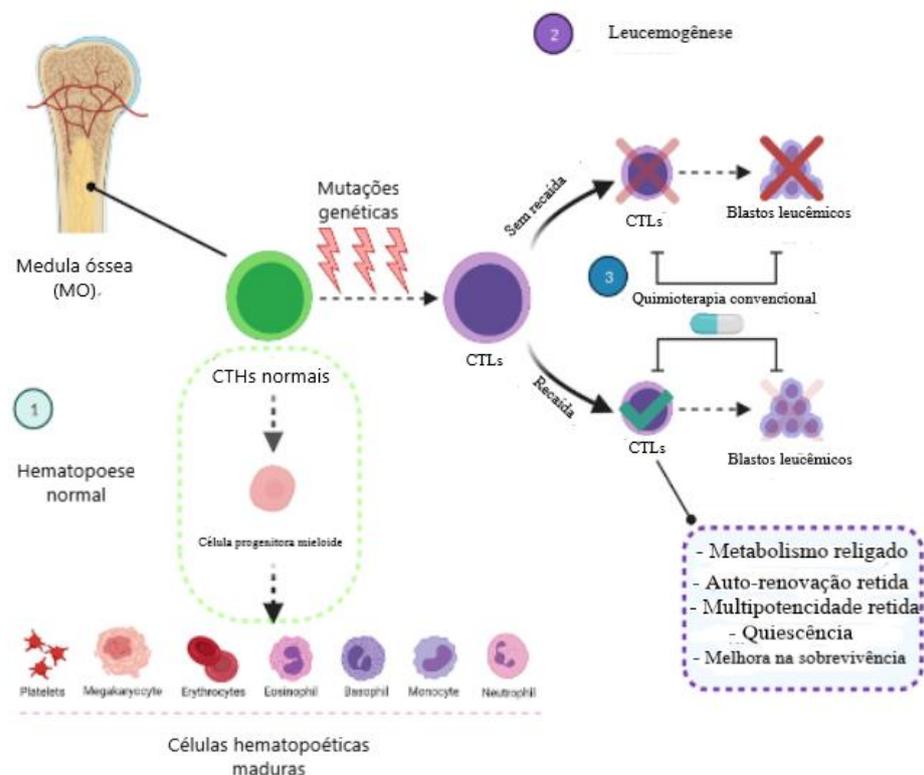
Devido a essas alterações no metabolismo das células leucêmicas, a reprogramação metabólica emerge como uma estratégia promissora (Presti et al., 2021). No contexto do metabolismo energético, a metformina, um fármaco já utilizado no tratamento de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, destaca-se como um relevante inibidor do complexo I da cadeia de transporte de elétrons na fosforilação oxidativa. Isso levanta a perspectiva do reposicionamento de fármacos, uma abordagem na qual uma droga existente é investigada para novos propósitos terapêuticos, apresentando-se como uma opção intrigante no tratamento do câncer (You et al., 2022).

Num estudo conduzido por Gronningsaeter et al., observou-se o efeito da metformina em células leucêmicas, demonstrando sua capacidade de ativar a proteína

quinase ativadora de AMP e inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Esse efeito resultou na inibição da fosforilação oxidativa, ocasionando elevados níveis de apoptose (Gronningsaeter et al., 2020). Em uma pesquisa realizada por Liu e colaboradores, por exemplo, constatou-se que as células leucêmicas apresentavam uma maior heterogeneidade metabólica devido à magnitude das alterações genéticas e, como resultado, determinadas linhagens celulares mostraram-se mais sensíveis ao tratamento com metformina e inibidores da fosforilação oxidativa (Liu et al., 2022).

**Figura 10 - Associação de quimioterapia convencional com fármacos antimetabólitos pode ser uma alternativa de tratamento.**

Mesmo com o avanço na quimioterapia da LMA, a recaída ainda é uma das grandes dificuldades para os pacientes. A probabilidade é também associada a resistência citada no tópico de metabolismo energético, evidenciando o processo de reprogramação metabólica da célula. Utilizar fármacos que inibem esse processo parece ser uma alternativa promissora para o tratamento da LMA. Adaptado de Mesbahi et al. 2022.



Fonte: Adaptado de Mesbahi et al., 2022.

Assim, a busca por novas abordagens terapêuticas eficazes torna-se de extrema importância na LMA, visando alcançar a remissão completa. O metabolismo energético emerge como um alvo potencial nesse processo, e as variações no conteúdo de mtDNA (mtDNAc) podem desempenhar um papel impactante na resposta ao tratamento. Diante desse cenário complexo, o presente estudo tem como objetivo avaliar o impacto das variações no mtDNAc em células leucêmicas submetidas ao tratamento com agentes indutores de apoptose.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da depleção do mtDNA em células leucêmicas frente ao tratamento *in vitro* com fármacos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir o bloqueio da replicação de mtDNA em células mononucleares leucêmicas de medula óssea e avaliar taxa de apoptose nessas células após redução do mtDNA;
- Induzir o bloqueio da replicação de mtDNA através do fármaco lamivudina nas linhagens MV4-11 (preferencialmente fosforilativa, *OXPHOS*) e OCI-AML3 (preferencialmente glicolítica);
- Avaliar as diferentes respostas desencadeadas através da taxa de apoptose induzida por 4 diferentes fármacos (Citarabina, Metformina, Venetoclax e Metotrexato).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

O estudo foi conduzido no Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial do Laboratório Central do Centro de Biociências (NHCL LABCEN/CB/UFPE), seguindo as normas e diretrizes regulamentadoras para pesquisa envolvendo seres humanos (Conselho Nacional de Saúde nº 466/2012). Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) das instituições envolvidas. Todos os pacientes e doadores saudáveis participantes da pesquisa receberam orientações sobre a proposta do projeto e forneceram sua assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

No total, 43 pacientes diagnosticados com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e tratados em centros de referência localizados no Nordeste e Ribeirão Preto (São Paulo, SP) foram incluídos no estudo. Os critérios de classificação/diagnóstico preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) foram estritamente seguidos (Arber et al., 2016). A participação dos pacientes foi precedida por autorização formal, após a leitura e compreensão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, seguindo as recomendações da Declaração de Helsinque.

Blastos e células mononucleares foram purificadas a partir de aspirados de medula óssea e/ou sangue periférico de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda (LMA), onde as amostras continham acima de 80% de células blásticas. Todos os subtipos FAB foram considerados elegíveis para o estudo, exceto pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda (FAB M3). Foram excluídos do estudo pacientes com LMA relacionada à terapia e indivíduos com história prévia de síndromes mielodisplásicas.

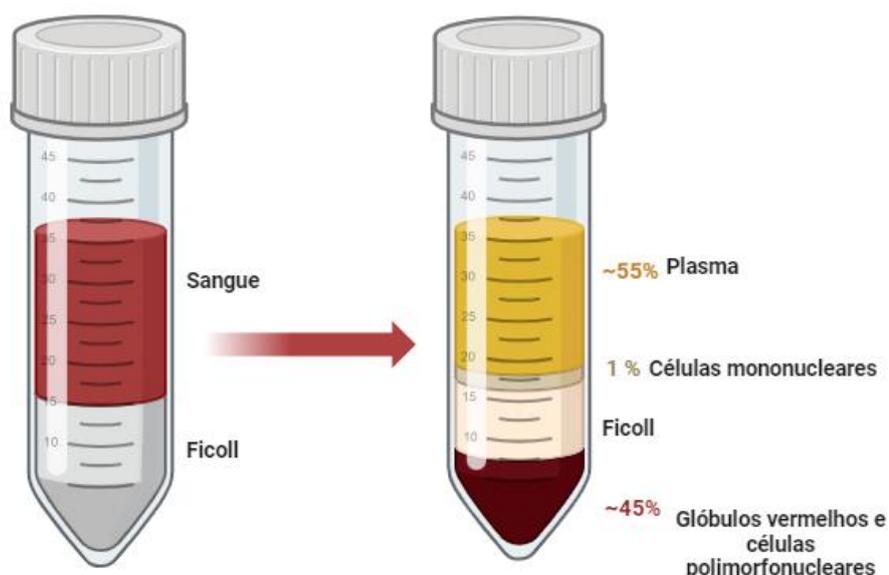
Todos os pacientes foram tratados com quimioterapia convencional, consistindo em daunorubicina (60 mg/m<sup>2</sup> diariamente por 3 dias) e citarabina (100 mg/m<sup>2</sup> diariamente por 7 dias) como terapia de indução, seguida por dois ou três ciclos de terapia de consolidação com altas doses de citarabina (> 1 g/m<sup>2</sup> a cada 12 horas com infusão de 3 horas nos dias 1 a 6).

## 4.2 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

A obtenção de células mononucleares foi realizada por meio do fracionamento do sangue utilizando um gradiente de densidade Ficoll-Histopaque. Na primeira etapa, o sangue do paciente foi adicionado ao Ficoll na mesma proporção, sendo centrifugado com uma parada de rotação lenta. O resultado foi a formação de um anel de células mononucleares localizado entre a camada de plasma e o Ficoll (Figura 11).

### Figura 11 - Obtenção de células mononucleares através da separação por ficoll.

Após centrifugação, é possível observar quatro camadas distintas. Inicialmente temos o plasma em sua maior constituição, seguida pelas células mononucleares, o ficoll e os glóbulos vermelhos. São as células mononucleares que são retiradas para análise.



Fonte: Figura gerada através do BioRender.

Essas células são posteriormente separadas, lavadas com PBS e incubadas em meio completo composto por interleucina humana-3 (20 ng/ml), G-CSF humano (20 ng/ml) e TPO (20 ng/ml) utilizando o meio de cultura da Gartner.

#### **4.3 UTILIZAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA E O CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS EMPACOTADORAS VIRAIS**

Para reduzir o número de cópias de mtDNA, empregou-se um vetor de expressão lentiviral contendo um RNA de interferência (shRNA - short hairpin RNA) destinado ao silenciamento do gene responsável pela codificação da polimerase gama (POLG) (TRCN0000290536 e TRCN0000296644, Sigma-Aldrich). Esta enzima está diretamente associada à replicação do DNA mitocondrial.

No procedimento de transformação bacteriana, as células quimicamente competentes foram previamente preparadas, utilizando cepas preservadas de DH5 $\alpha$  e BL-21 (células *E. coli*), com adição de 45.5 ng do plasmídeo misturados com 50  $\mu$ L de DH5 $\alpha$  e BL-21.

Os tubos foram colocados em gelo por 15 minutos e, em seguida, mantidos a 42°C por no máximo 1 minuto. Após o choque térmico necessário para a abertura da membrana das células quimicamente competentes (permitindo assim a entrada do plasmídeo), tornou-se crucial nutrir as células para a reconstituição da membrana previamente exposta. Para isso, adicionou-se 50  $\mu$ L de meio LB líquido aos transformados, deixando-os na estufa por aproximadamente 1 hora a 31°C. Após o período de recuperação, os transformados foram semeados em placas de ágar LB e colocados na estufa a 31 °C durante a noite. As colônias visíveis na placa foram então inoculadas em meio LB líquido durante a noite para expansão, visando a realização da extração de DNA plasmidial.

Para a extração de DNA plasmidial, empregou-se o método de lise alcalina. O inóculo foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm e ressuspensão em 150 µL de buffer de ressuspensão. Em seguida, adicionou-se 200 µL do buffer de lise, misturando por inversão até a formação de viscosidade. Posteriormente, adicionou-se 300 µL do buffer de neutralização, invertendo o tubo pelo menos 4 vezes.

A solução foi então submetida a uma centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, e após isso, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, com adição de isopropanol, sendo posteriormente incubado em -80°C por 30 minutos. Após a incubação, o produto foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm, com a subsequente remoção do sobrenadante e adição de 600 µL de etanol a 70%. Após a adição, a amostra foi centrifugada novamente, removendo o sobrenadante e permitindo a evaporação do etanol por aproximadamente 30 minutos. O pellet foi ressuspensão em 50 µL de TE-RNase (pH 8,0). Vale ressaltar que o DNA extraído nesse processo não é purificado. Assim, foi necessário realizar uma etapa de purificação utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega, seguida pela quantificação dos dados (Tabela 2).

**Tabela 2 - Quantificação do DNA plasmidial**

Quantificações e razões do DNA plasmidial a ser utilizado para o processo de transfecção.

<i>DNA PLASMIDIAL</i>	<i>CONCENTRAÇÃO (ng/µL)</i>	<i>A260/280</i>
<b><i>shPOLG</i></b>	842,9 ng/µL	1,92
<b><i>shCTRL</i></b>	696,6 ng/µL	1,98
<b><i>pCMVδR8.2</i></b>	474,4 ng/ µL	2,00
<b><i>VSV-G</i></b>	393,5 ng/ µL	1,92

Fonte: Autoria própria.

A linhagem 293T foi utilizada para produção das partículas lentivirais e cultivadas em garrafas T75 com uma concentração de  $2 \times 10^6$  células, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 4 mM de L-glutamina e 1% de penicilina/streptomicina (doravante chamado meio completo), até atingir uma confluência de 30 a 40%. Em seguida, essas células foram transfectadas com 3  $\mu$ g do plasmídeo contendo o shRNA para o gene POLG (aqui chamado de pLKO-shPOLG) ou 3  $\mu$ g do seu respectivo controle (aqui chamado de shCTRL, uma mistura de RNA de interferência não humano), juntamente com 3  $\mu$ g do vetor necessário para a expressão de proteínas virais envolvidas no empacotamento (pCMV $\delta$ R8.2) e 750 ng da glicoproteína do envelope do vírus da estomatite vesicular VSV-G (pMDG). Quarenta e oito horas após a transfecção, o sobrenadante (meio de cultura) contendo partículas virais foi coletado, filtrado (filtro de 22  $\mu$ m) e usado para infectar as células-alvo.

O plasmídeo shPOLG contém o gene de resistência à puromicina em seu RNA. Para confirmar o sucesso da transfecção, foi realizado o protocolo de titulação lentiviral com cristal violeta da HORIZON. Inicialmente,  $2,5 \times 10^5$  células foram plaqueadas em uma placa de 6 poços no primeiro dia. No segundo dia, o vírus foi titulado com uma diluição seriada de 10x, com as seguintes concentrações: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup>. Ao sexto poço foi adicionado apenas meio de transdução sem vírus, servindo como controle negativo. No terceiro dia, o meio contendo concentrações pré-determinadas de puromicina (concentração inibitória semi-máxima, IC<sub>50</sub>: 0,5  $\mu$ g/mL) foi adicionado. A multiplicidade de infecção (MOI) utilizada foi de 10.

#### **4.4 INFECÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES COM LENTIVÍRUS**

As células mononucleares foram transduzidas com as partículas lentivirais por meio do protocolo de infecção utilizando polibreno com spinoculação. Inicialmente, os tubos foram rotulados e  $1 \times 10^6$  células foram peletadas a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionados 2 ml do meio contendo o lentivírus em concentração adequada, juntamente com polibreno (8 mg/ml). O polibreno atua como um acelerador no processo de infecção das células. Esses tubos foram então centrifugados a 800g por 90 minutos, sendo durante esse processo de centrifugação longa que a infecção das células pelo lentivírus ocorreu.

O pellet foi ressuspensão, transferido para placas de 6 poços e incubado em estufa a 37°C por 6 horas. Em seguida, essas células foram centrifugadas novamente a 300g por 10 minutos, e o meio contendo o vírus e o polibreno foi descartado. As células foram, então, ressuspensas em 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Essa placa foi incubada por 48 a 72 horas, seguida pela seleção com puromicina.

Em seguida, foi essencial realizar um processo seletivo com adição do antibiótico por duas semanas para obter apenas as células infectadas pelo lentivírus.

#### **4.5 AQUISIÇÃO DOS FÁRMACOS LAMIVUDINA, METFORMINA, VENETOCLAX, CITARABINA E METOTREXATO**

A lamivudina é um análogo sintético da pirimidina, também conhecido como 2,3-didesoxi-3'-tiocitidina, indicado para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sem apresentar muitos efeitos citotóxicos. Estudos recentes indicam sua atividade na redução do conteúdo de mtDNA devido à sua

função de inibir a polimerase gama (POLG) em linhagens celulares de LMA (Lyianage et al. 2017).

O fármaco foi empregado no projeto para teste em linhagens celulares, avaliando se ocorreu efetivamente uma redução do mtDNA e foi adquirido por meio da empresa Interprise Brasil (São Paulo). Para a adição da lamivudina nas linhagens celulares, foram utilizadas concentrações de 75  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , as quais não demonstram efeitos citotóxicos, mas são eficazes na modificação do mtDNA.

Os fármacos metformina, metotrexato, citarabina e venetoclax foram obtidos por meio de doações do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP). O venetoclax e a citarabina são frequentemente utilizados no tratamento de pacientes com LMA. A metformina foi escolhida por ser um importante inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons. O metotrexato é uma droga metabólica associada ao metabolismo dos folatos e foi selecionado para avaliar o impacto do mtDNA em outras vias metabólicas.

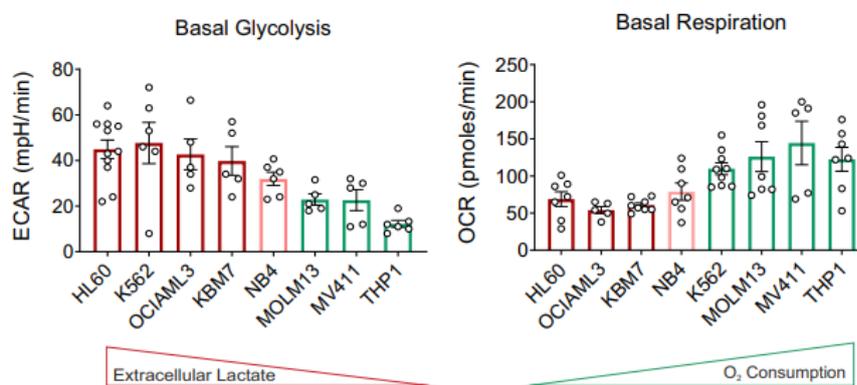
#### **4.6 CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES**

Linhagens celulares humanas de LMA foram selecionada como alvos para o tratamento com lamivudina, levando em consideração seu perfil metabólico. Em um estudo conduzido por Erdem e colaboradores (Erdem et al. 2022), foi avaliado um grupo de linhagens celulares leucêmicas com base no conteúdo de lactato extracelular, indicativo da glicólise basal, e no consumo de oxigênio, indicativo da respiração basal. As células OCI-AML3 apresentaram maior consumo de lactato extracelular, sendo consideradas mais glicolíticas, enquanto a MV4-11 apresentou maior consumo de oxigênio, sendo predominantemente fosforilativa (figura 12).

Ambas as células foram cultivadas em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO.

**Figura 12 - Avaliação das linhagens celulares de acordo com o lactato extracelular e consumo de oxigênio.**

Pode-se observar que as linhagens celulares HL-60, K562, OCI-AML3 e KBM7 apresentaram maior quantidade de lactato extracelular. Linhagens como MOLM13, MV4-11 e THP1 apresentaram maior consumo de oxigênio. Levando em consideração nosso banco de células, selecionamos então a OCI-AML3 e MV4-11 para avaliar as diferenças metabólicas frente ao tratamento.



Fonte: Erdem et al., 2022

#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO MTDNA

A quantificação relativa do número de cópias do mtDNA das amostras e linhagens estudadas foi conduzida utilizando a química SYBR®Green PowerUp MasterMix (Applied Biosystems®, EUA) na plataforma QuantStudio 5 (ThermoFisher, EUA), em placas de 96 poços para as análises. Foram então empregados oligonucleotídeos iniciadores para um gene específico do mtDNA, MT-CYTB, que codifica o citocromo B mitocondrial, normalizando os dados pela amplificação de um produto referente a um gene de cópia única no DNA nuclear, o gene da piruvato quinase (*PKLR*) (Tabela 3).

**Tabela 3 - Sequência dos primers e tamanho esperado do produto.**

Genes utilizados com a sequência dos primers e o tamanho esperado. Sua eficiência foi testada através de diluições seriadas usando o cálculo:  $E = 10^{(-1/\text{slope})-1}$ .

<i>Genes</i>	<i>Sequência dos primers</i>	<i>Tamanho esperado</i>	<i>Eficiência</i>
<b>CytB</b>	<b>Foward:</b> CACGATTCTTTACCTTTCACTTCATC <b>Reverse:</b> TGATCCCGTTTCGTGCAAG	89 pb	105.1 %
<b>PKLR</b>	<b>Foward:</b> AGCCCAAATGGCCTTGAA <b>Reverse:</b> AGAGACAGAATGCCAGTGAGC	84 pb	96.2%

Fonte: Autoria própria.

Todas as reações foram realizadas em duplicata. A solução de reação foi preparada combinando SYBR™ Green PCR Master Mix e 320 nM de cada um dos primers. Os controles negativos foram inclusos sem adição de amostra (no template control) para garantir especificidade da reação e amostras referências, garantindo a reprodutibilidade dos resultados.

O conteúdo relativo de mtDNA foi definido como o valor total de mtDNA subtraído pelo valor total de nDNA. Por conseguinte, a diferença de ciclos (Ct) foi calculada para cada replicata por meio do método comparativo do  $\Delta\text{Ct}$  ( $\text{Ct CYTB} - \text{Ct PK1}$ ) e apresentados por meio da fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , onde  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct DNA referência (controle)}$ .

#### 4.8 ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT

O ensaio de MTT foi empregado para mensurar a atividade metabólica celular e a viabilidade, sendo utilizado no projeto para avaliar a citotoxicidade dos fármacos mencionados anteriormente. O ensaio fundamenta-se na redução de um sal de tetrazólio amarelo (MTT) para cristais de formazan de coloração roxa por células metabolicamente ativas. Quanto mais intensa a coloração da solução, maior é o número de células viáveis. O protocolo adotado seguiu as orientações da Merck para ensaio de citotoxicidade celular.

As linhagens celulares foram incubadas em placas de 96 poços, com uma concentração de  $4 \times 10^4$ /poço, em 100  $\mu$ L de meio de cultura contendo quantidades variadas dos fármacos. Essas células foram incubadas por 24 e 72 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, adicionou-se 10  $\mu$ L do reagente de marcação MTT (concentração final de 0,5 mg/ml) em cada poço. A placa foi incubada por 4h sob atmosfera umidificada e, em seguida, adicionou-se 100  $\mu$ L de solução de solubilização para dissolver os cristais de formazan (nesse caso, utilizamos SDS 20%).

A placa permaneceu em repouso durante a noite, em uma incubadora com atmosfera umidificada, e posteriormente a absorbância das amostras foi medida utilizando um leitor de microplacas (ELISA). O comprimento de onda utilizado para a leitura da absorbância do produto do formazan foi de 560 nm.

#### **4.9 ENSAIO DE APOPTOSE EM CÉLULAS LEUCÊMICAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA E LINHAGENS CELULARES**

Para investigar o papel do conteúdo de mtDNA na apoptose,  $5 \times 10^5$  células mononucleares foram incubadas por 48 horas, seja na presença de um veículo ou citarabina (concentração inibitória semi-máxima, IC<sub>50</sub>: 100 nM), em uma placa de 24 poços. No caso das linhagens celulares, as células foram incubadas por 24 horas, expondo-as a duas concentrações de cada fármaco ou veículo em placa de 24 poços.

A porcentagem de células apoptóticas do controle não tratado foi subtraída as células expostas a droga para acomodar variações específicas das amostras na viabilidade celular geral. Toda essa etapa foi realizada em duplicata e em cada amostra um mínimo de 10.000 eventos foram adquiridos no citometro de fluxo FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

A taxa de apoptose foi então determinada usando o ensaio de ligação da Anexina V-FITC e 7AAD (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e analisadas por métodos padrões de citometria de fluxo. O quadrante determinado foi o quadrante duplo marcado, (Anexina V positiva, 7AAD positivo), levando em consideração a apoptose tardia.

#### **4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise de correlação entre apoptose e conteúdo de mtDNA, empregou-se o coeficiente de correlação de Spearman, considerando um intervalo de confiança de 95%. Para confirmar a redução do conteúdo de mtDNA, aplicou-se o teste de Mann-Whitney. Para avaliação de amostras emparelhadas, foi realizado o teste t de Student para amostras pareadas. Para determinação da IC<sub>50</sub>, adotou-se a regressão

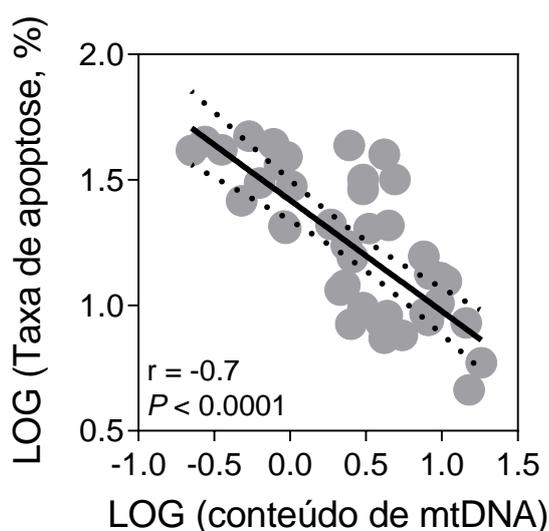
não linear de inibição dose-resposta, considerando três parâmetros. No que diz respeito à análise de apoptose nas linhagens celulares, utilizou-se ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Sidak. Todos os P-valores foram bilaterais com nível de significância 0,05. Todas as análises foram conduzidas utilizando o GraphpadPrism 8.

## 5 RESULTADOS

Inicialmente, as células mononucleares da medula óssea (43 amostras) foram meticulosamente coletadas e mantidas em meio de cultura específico, enriquecido com interleucinas e fatores de crescimento essenciais para garantir sua viabilidade e expansão em cultura. Subsequentemente, essas células foram submetidas a um tratamento com citarabina na concentração de 100 nM durante um período de 48 horas, após o qual foram submetidas a análise detalhada para investigar a relação entre apoptose e conteúdo de mtDNA (mtDNAc). Como resultado dessa análise, foi possível observar uma correlação significativa e inversa entre a taxa de apoptose induzida pela citarabina e o nível de mtDNAc nas células (Figura 13) ( $P < 0.0001$ ) ( $r = -0.75$ , 95% IC: -0.85 a -0.58). Esses achados iniciais revelam que quanto maior o conteúdo de mtDNA, maior a resistência a citarabina em células mononucleares.

**Figura 13 - Relação da taxa de apoptose e mtDNAc em células mononucleares após incubação com AraC.**

Nota-se que a medida que há um aumento no mtDNAc, a taxa de apoptose tende a diminuir, possivelmente indicando que a relação do mtDNAc impacta diretamente na resposta ao tratamento.

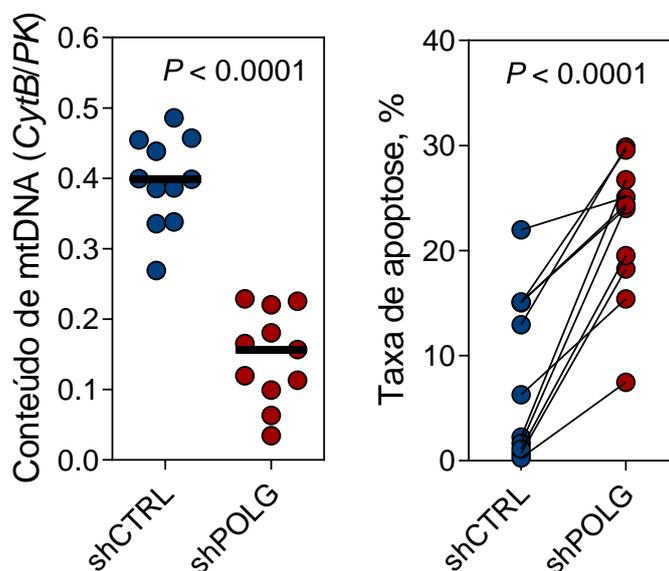


Das 43 amostras inicialmente coletadas, foi constatado que 11 delas exibiram um conteúdo de mtDNA particularmente elevado, após dicotomização dos dados. Essas 11 amostras foram selecionadas para uma análise aprofundada, visando confirmar a redução do mtDNAc por meio do silenciamento da expressão gênica utilizando shRNA. Este experimento foi conduzido com o intuito de avaliar de forma mais precisa o impacto dessa redução do mtDNAc nas células frente à indução da apoptose pela citarabina.

Após a infecção com o lentivírus contendo o shRNA silenciador da POLG, procedemos à análise molecular para confirmar a redução do conteúdo de mtDNA, utilizando a relação *CytB/PKLR* como indicador. Os resultados demonstraram que as células transduzidas com o shRNA apresentaram uma significativa diminuição do mtDNAc em comparação com as células do controle ( $P < 0.0001$ ). Como consequência direta dessa redução no mtDNAc, utilizando o teste de amostras pareadas, observou-se uma marcante elevação dos níveis de apoptose nas células tratadas com citarabina após a depleção do mtDNA, constatando com o grupo controle ( $P < 0.0001$ ) (Figura 14). Esses resultados sublinham a importância crucial do mtDNA na resposta a terapia, com relevância clínica potencial.

**Figura 14 - Relação do conteúdo de DNA mitocondrial e taxa de apoptose após utilização de shRNA.**

O conteúdo de mtDNA foi menor em relação ao seu controle. Da mesma forma, após a redução do mtDNA e adição da citarabina, foi possível confirmar que a taxa de apoptose em resposta a citarabina aumentou após redução do conteúdo de mtDNA.



Diante das conclusões promissoras provenientes das análises realizadas em células mononucleares, decidimos estender nossas investigações para linhagens celulares. Para isso, escolhemos duas linhagens representativas com perfis metabólicos distintos: OCI-AML3, caracterizada por um metabolismo predominantemente glicolítico, e MV4-11, com um metabolismo preferencialmente fosforilativo. Esta abordagem permitiu-nos explorar de forma mais abrangente o impacto da depleção do mtDNA em diferentes contextos metabólicos.

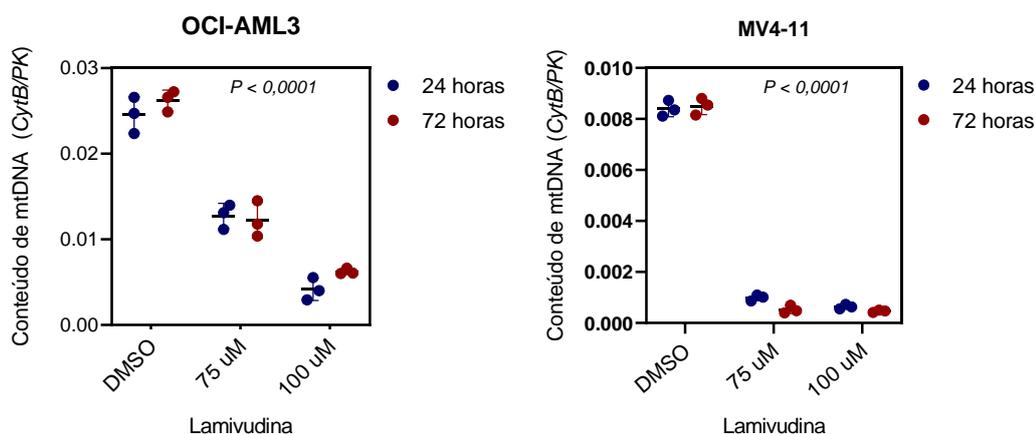
Para avaliar o efeito da depleção do mtDNA nessas linhagens celulares, optamos por empregar a lamivudina, um fármaco comumente utilizado no tratamento de pacientes infectados pelo HIV. Além de suas propriedades antivirais, a lamivudina tem sido reconhecida por sua capacidade de induzir a depleção do mtDNA, atuando por meio da inibição da polimerase gama. Essa escolha estratégica nos permitiu

explorar os efeitos da depleção do mtDNA em um contexto farmacológico familiar.

Ambas as linhagens celulares foram tratadas com duas concentrações distintas do fármaco, a saber: 75 $\mu$ M e 100 $\mu$ M. Embora ambas as concentrações não tenham demonstrado efeitos citotóxicos nas linhagens celulares em estudo, foi observado que foram suficientes para induzir a depleção do mtDNA ( $P < 0.0001$ ). Os valores de IC50 encontrados para a OCI-AML3 e MV4-11 foram de 1,4 mM  $\pm$  14 e 780 $\mu$ M  $\pm$  14, respectivamente.

**Figura 15 - Redução do conteúdo de mtDNA após adição do fármaco lamivudina.**

Foi possível reduzir o conteúdo de mtDNA em ambas as linhagens após adição da lamivudina nas concentrações de 75 $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Nota-se que a OCI-AML3 é dose-dependente, enquanto que a MV4-11 teve seu conteúdo reduzido drasticamente mesmo com doses mais baixas.



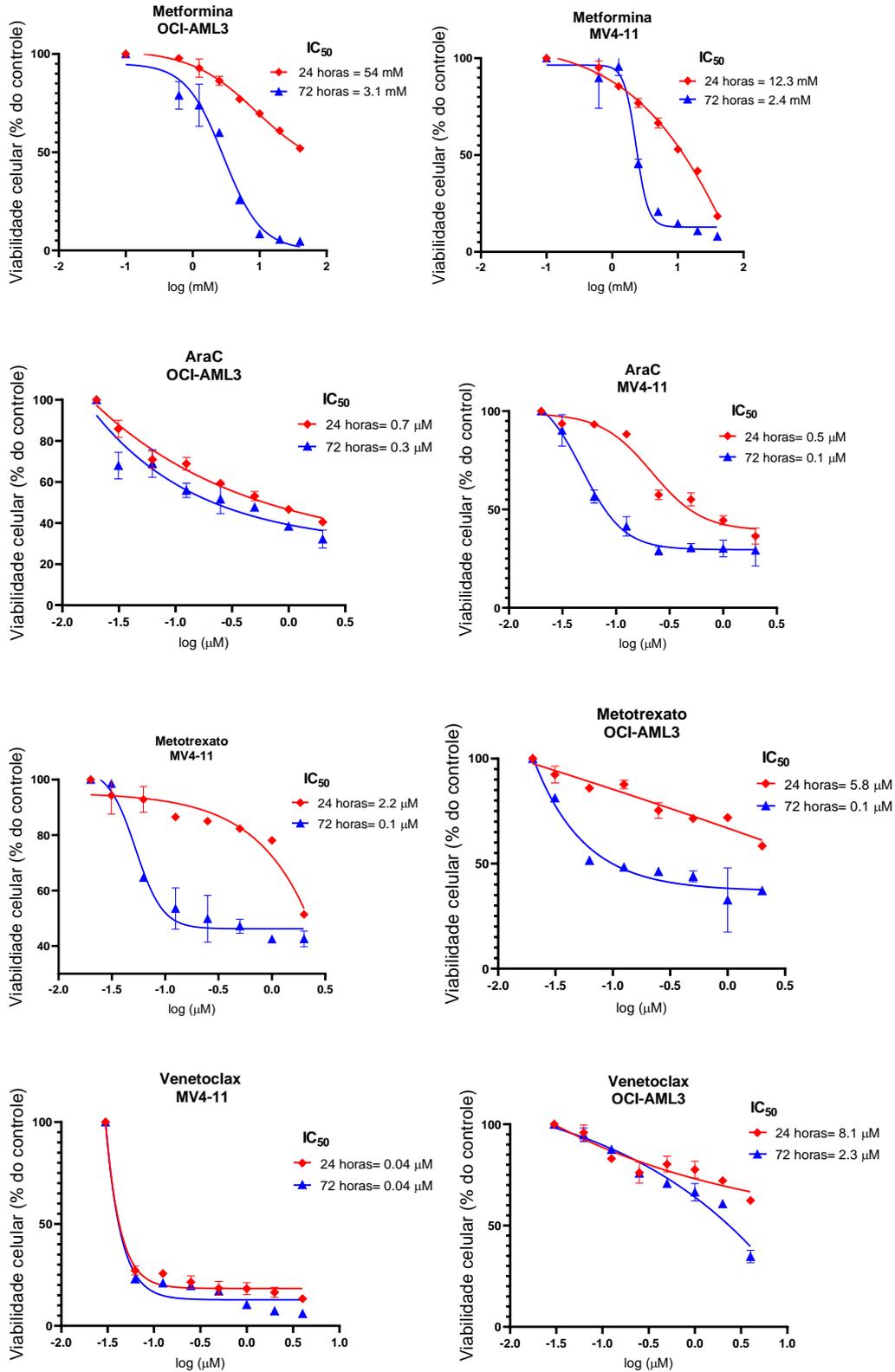
Na fase subsequente, optamos por avaliar a concentração inibitória máxima (IC50) dos fármacos por meio do ensaio de redução do MTT. Os compostos selecionados para este estudo incluem a citarabina e o venetoclax, ambos aprovados para o tratamento da leucemia mieloida aguda (LMA), além da metformina e o metotrexato, que são drogas metabólicas que foram reposicionadas para potenciais usos terapêuticos.

Ao realizar os experimentos, determinamos as concentrações inibitórias para períodos de exposição de 24 e 72 horas em ambas as linhagens estudadas. Este

procedimento nos permitiu identificar distintos padrões de sensibilidade entre as linhagens. Observamos que a linhagem MV4-11 demonstrou maior sensibilidade ao venetoclax, por exemplo. Além disso, constatamos notável resistência da OCI-AML3 aos fármacos metabólicos que atuam como inibidores da fosforilação oxidativa (Figura 16).

### Figura 16 - IC<sub>50</sub> dos fármacos selecionados.

Foram avaliadas a IC<sub>50</sub> da metformina, AraC, metotrexato e venetoclax em 24 e 72 horas. Nota-se uma resistência maior da OCI-AML3 para fármacos metabólicos que afetam a fosforilação oxidativa, além de uma notável sensibilidade da MV4-11 (preferencialmente fosforilativa) para o venetoclax.



Após a determinação dos valores de IC50 dos fármacos, prosseguimos com o ensaio de apoptose em linhagens celulares, buscando investigar o efeito direto da redução do mtDNA na morte celular programada em resposta aos tratamentos, considerando os diferentes metabolismos das linhagens estudadas. O experimento foi conduzido ao longo de um período de 24 horas e foi replicado para garantir a robustez dos resultados. Durante o ensaio, as células foram expostas individualmente aos fármacos e também a uma combinação dos fármacos com a lamivudina.

Após análise, foi constatado que as células OCI-AML3, com um perfil glicolítico, demonstraram sensibilidade à citarabina, mas revelaram resistência a fármacos metabólicos. No entanto, embora a adição de lamivudina não tenha exercido um impacto significativo na maioria dos fármacos, a redução do conteúdo de mtDNA, em conjunto com doses mais elevadas de venetoclax e metformina, resultou em um aumento notável da apoptose induzida por essas substâncias. Este achado ressalta a complexidade das interações entre os processos metabólicos e os mecanismos de apoptose (Tabela 4) (figura 17).

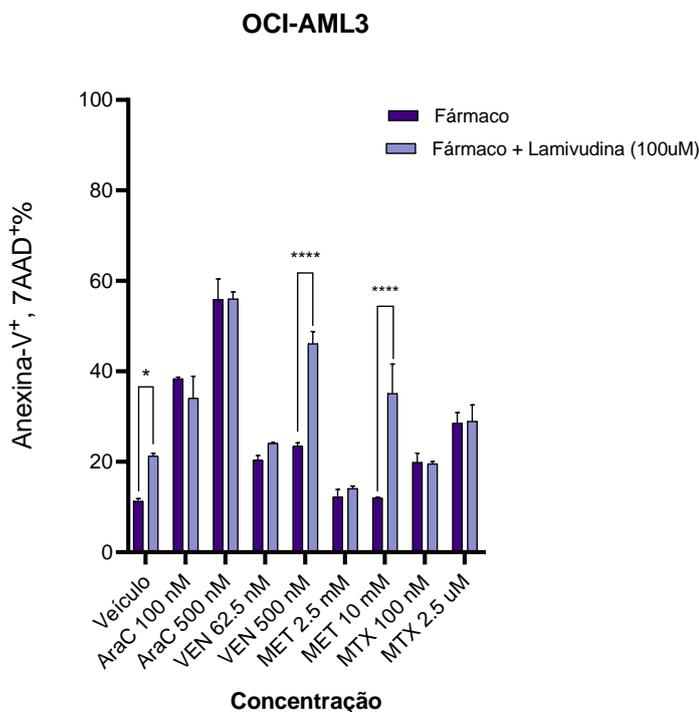
**Tabela 4 - Porcentagem de apoptose tardia antes e após tratamento com lamivudina em células OCI-AML3.**

Porcentagem das amostras duplicadas antes e após adição da lamivudina. Nota-se aumento da porcentagem de células em apoptose tardia após inibição do mtDNA com doses mais altas de venetoclax e metformina.

OCI-AML3	Fármaco (Anexina V <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %)		Fármaco + lamivudina (Anexina V <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %)	
Veículo	11.7	10.9	21.7	20.9
Citarabina 100 nM	38.1	38.6	30.7	37.5
Citarabina 500 nM	59.1	52.7	54.9	57.1
Venetoclax 62.5 nM	21.1	19.7	24.2	24
Venetoclax 500 nM	23	24	48	44.2
Metformina 2.5 mM	11	13.4	14.5	13.7
Metformina 10 mM	11.9	12.1	39.7	30.5
Metotrexato 100 nM	21.3	18.4	19.9	19.2
Metotrexato 2.5 μM	30.2	26.9	31.5	26.4

### Figura 17 - Análise de apoptose em linhagem OCI-AML3.

É possível observar aumento da apoptose nessas células quando em contato com a citarabina. No entanto, após redução do conteúdo de mtDNA através da lamivudina, não houve impacto significativo na apoptose induzida pelos fármacos. Porém, ao aumentar as doses dos fármacos metabólicos, essa apoptose aumenta. Esse processo indica a resistência a tratamentos metabólicos frente a células metabolicamente distintas.



Contudo, na linhagem MV4-11, a inclusão da lamivudina revelou um efeito direto significativo na indução da apoptose celular em resposta a todos os fármacos avaliados, em dosagens distintas. Esta descoberta sugere o potencial sinérgico da lamivudina em aumentar a eficácia dos tratamentos farmacológicos na linhagem MV4-11, considerada preferencialmente fosforilativa (Tabela 5) (figura 18).

Considerando todas as observações feitas até o momento, torna-se evidente que o conteúdo de mtDNA teve um impacto significativo na apoptose induzida por fármacos em células mononucleares. No entanto, é importante ressaltar que nem todas as células respondem de maneira uniforme à manipulação do mtDNA. Os resultados na OCI-AML3, conhecida por seu perfil metabólico predominantemente glicolítico, indicam que uma resposta positiva à redução do mtDNA ocorre

principalmente em situações em que há uma combinação de doses elevadas de fármacos metabólicos. Essas descobertas sugerem uma interação complexa entre o conteúdo de mtDNA e os mecanismos de apoptose, destacando a importância de considerar o contexto metabólico específico de cada célula ao planejar intervenções terapêuticas.

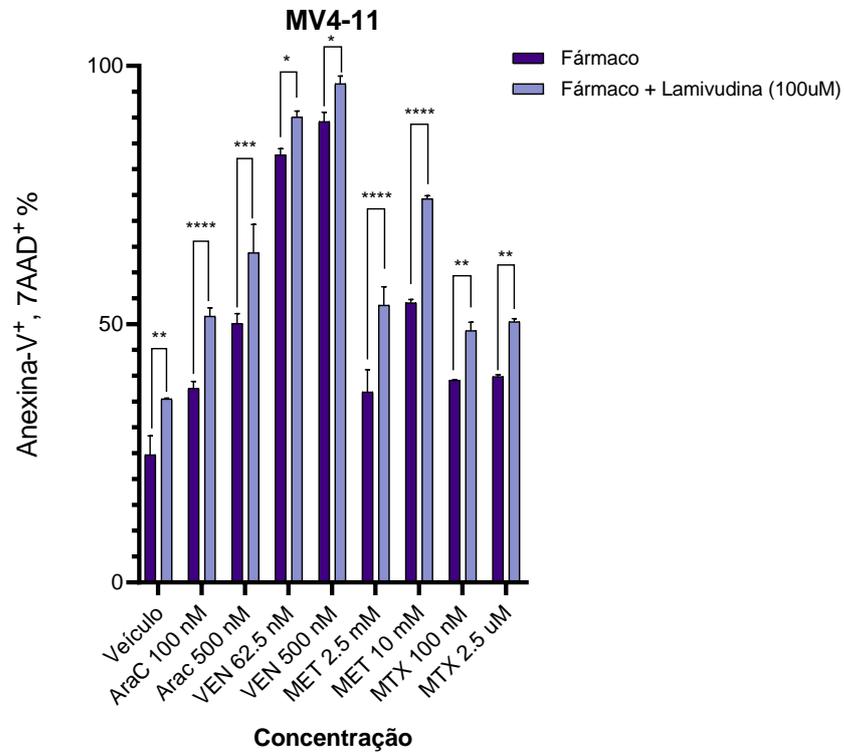
**Tabela 5 - Porcentagem de apoptose tardia antes e após tratamento com lamivudina em células MV4-11.**

Porcentagem das amostras duplicadas antes e após adição da lamivudina. Nota-se aumento considerável da apoptose induzida por fármacos após redução do conteúdo de mtDNA, sendo justificado então pelo metabolismo fosforilativo e sua desregulação após modificação do conteúdo de mtDNA.

MV4-11	Fármaco (Anexina V <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %)		Fármaco + lamivudina (Anexina V <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %)	
Veículo	22.1	27.3	35.4	35.6
Citarabina 100 nM	36.6	38.5	52.7	50.4
Citarabina 500 nM	51.5	48.8	60	67.7
Venetoclax 62.5 nM	83.6	81.9	90.9	89.3
Venetoclax 500 nM	87.9	90.5	95.5	97.6
Metformina 2.5 mM	33.8	39.9	56.2	51.1
Metformina 10 mM	53.7	54.6	73.8	74.7
Metotrexato 100 nM	39.2	39.1	49.9	47.6
Metotrexato 2.5 µM	39.6	40.1	50.0	50.9

**Figura 18 - Análise de apoptose em linhagem MV4-11.**

É possível observar um aumento considerável nos níveis de apoptose celular após adição de lamivudina. Também observamos uma taxa discrepante do venetoclax em duas dosagens por ser um fármaco indutor de apoptose.



## 6 DISCUSSÃO

O estudo do metabolismo do câncer tem experimentado um rápido avanço, impulsionando o surgimento de novas abordagens terapêuticas. Como mencionado anteriormente, embora a maioria dos pacientes com LMA responda inicialmente bem à quimioterapia, muitos acabam por sofrer recidiva. Essa recorrência está frequentemente associada à heterogeneidade clonal das células leucêmicas. Ao relacionarmos nossos achados com outros estudos, percebemos que pacientes pediátricos com LMA frequentemente apresentam deleções no mtDNA, resultando em alterações no processo de respiração celular, especialmente na cadeia transportadora de elétrons, o que pode promover maior resistência à apoptose (Guerra et al. 2017).

Previamente, no estudo do nosso grupo realizado por Lima e colaboradores, observou-se uma associação entre um elevado conteúdo de mtDNA e uma menor sobrevida livre de doença em pacientes com LMA-não LPA (Dados não publicados). Além disso, um estudo conduzido por Kang et al examinou as implicações clínicas e patológicas de alterações no genoma mitocondrial de 55 paciente pediátricos com LMA. Eles observaram um aumento de aproximadamente duas vezes no conteúdo de mtDNA em comparação com os controles, resultando em resistência a determinados tratamentos (Kang et al. 2016)

Esses resultados corroboram com as descobertas do nosso projeto, onde o alto nível de mtDNA foi relacionado a baixos índices de apoptose após o tratamento com citarabina. Como consequência, observamos que os níveis de apoptose celular foram elevados após a depleção do mtDNA. A hipótese é que as células tenham sofrido perturbações em seu metabolismo, resultando na disrupção dos processos energéticos e, conseqüentemente, no aumento da morte celular.

As variações no número de cópias de mtDNA sugerem fortemente uma

possível relação direta com a origem e a agressividade de um determinado tecido tumoral. Essa associação, em parte, pode explicar como as alterações no conteúdo de mtDNA influenciam a clínica dos pacientes. Com base nos resultados anteriores e em consonância com outros estudos, é perceptível que as mudanças no conteúdo de mtDNA desencadeiam alterações metabólicas nas células leucêmicas, podendo resultar em aumento da resistência à apoptose e maior produção de energia celular (Liyanage et al. 2017; Nakamura-Ishizu et al. 2020).

Entretanto, em uma doença tão heterogênea como a LMA, um estudo conduzido por Yehudai e colaboradores observou que a depleção do conteúdo de mtDNA (mtDNAc) não ocasionou alterações na viabilidade celular em todas as células avaliadas, levantando a questão sobre até que ponto o mtDNAc pode ser considerado um marcador válido para abordagens terapêuticas (Yehudai et al. 2018).

Diante dessa premissa, tomamos a decisão estratégica de empregar células com perfis metabólicos distintos, visando aprofundar nossa compreensão sobre o impacto da depleção do mtDNAc em diferentes contextos celulares. A linhagem MV4-11, conhecida por seu metabolismo preferencialmente fosforilativo, revelou um aumento notável na apoptose após a redução do mtDNAc, o que se traduziu em uma resposta terapêutica positiva. Surpreendentemente, observamos que nas células com um metabolismo predominantemente glicolítico, como a OCI-AML3, somente doses mais elevadas dos fármacos metformina e venetoclax resultaram em benefícios significativos após a redução do mtDNAc.

Esse achado sugere uma complexa interação entre o estado metabólico das células e sua resposta à depleção do mtDNAc, destacando a necessidade de uma abordagem diferenciada para otimizar a eficácia dos tratamentos farmacológicos frente a diferentes subtipos celulares.

Esse processo é justificado em estudos anteriores, como no de Liu e

colaboradores, onde foi observado que o tratamento das células leucêmicas com venetoclax resultou em um aumento nos níveis de glicólise e metabolismo dos ácidos graxos (Liu et al. 2022). Sugerindo que células preferencialmente glicolíticas podem potencializar seu metabolismo ao terem seu processo mitocondrial perturbado, gerando resistência aos tratamentos.

Indubitavelmente, o mtDNAC surge como um indicador promissor para avaliar a eficácia terapêutica em pacientes com LMA. No entanto, é imperativo conduzir estudos adicionais para fortalecer e validar nossas descobertas. Além disso, é essencial explorar se o mtDNAC pode desempenhar papel crucial no contexto da refratariedade ao tratamento e na avaliação da doença residual após quimioterapia. Essas investigações adicionais são fundamentais para aprofundar nossa compreensão dos mecanismos subjacentes à resposta terapêutica em pacientes com LMA e podem potencialmente abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas.

## 7 CONCLUSÕES

Nossos achados coletivos fornecem uma base sólida para destacar a importância clínica do conteúdo de mtDNA na LMA. O elevado conteúdo de mtDNA foi consistentemente associado à resistência à apoptose induzida pela citarabina, um dos principais fármacos utilizados no tratamento da LMA. A depleção do mtDNA demonstrou ser uma estratégia eficaz para aumentar a sensibilidade das células mononucleares à citarabina.

Além disso, nossos resultados revelaram uma relação direta entre os perfis metabólicos das células e a resposta aos diferentes fármacos utilizados no tratamento da LMA. Em particular, observamos uma resposta aprimorada em subgrupos específicos de fármacos, especialmente na linhagem MV4-11, caracterizada por um metabolismo preferencialmente fosforilativo. No entanto, é importante ressaltar que algumas células mostraram maior resistência ao tratamento, respondendo efetivamente apenas a doses mais elevadas dos fármacos.

Esses achados ressaltam o potencial do mtDNA, avaliado no momento do diagnóstico, como uma ferramenta valiosa para identificar o estado metabólico energético das células leucêmicas. Essa informação pode ser crucial para orientar decisões terapêuticas mais precisas e personalizadas, visando maximizar a eficácia do tratamento e minimizar a resistência à terapia.

## REFERÊNCIAS

ACUTE MYELOID LEUKEMIA: Prognosis, Treatment, and Heterogeneity. *Frontiers in Genetics*, 1, 133. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00133>

ARBER DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M and Vardiman JW (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127: 2391.

ASADA S, Kitamura T. Clonal hematopoiesis and associated diseases: A review of recent findings. *Cancer Sci.* 2021 Oct;112(10):3962-3971. doi: 10.1111/cas.15094. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34328684; PMCID: PMC8486184.

BAZINET, A., & Assouline, S. (2021). Expert Review of Hematology A review of FDA-approved acute myeloid leukemia therapies beyond '7+3.' *Expert Review of Hematology*, 14(2), 185–198. <https://doi.org/10.1080/17474086.2021.1875814>

BELYAVSKY, A., Petinati, N., & Drize, N. (2021). Hematopoiesis during ontogenesis, adult life and aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms22179231>

BENDARI M, Khoubila N, Cherkaoui S, Hda N, Qachouh M, Lamchahab M, et al. Current Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia [Internet]. *Chromosomal Abnormalities*. IntechOpen; 2020.

BHATTACHARYA, B., Mohd Omar, M. F., & Soong, R. (2016). The Warburg effect and drug resistance. *British Journal of Pharmacology*, 173(6), 970–979.

BOHN T, Rapp S, Luther N, Klein M, Bruehl TJ, Kojima N, Aranda Lopez P, Hahlbrock J, Muth S, Endo S, Pektor S, Brand A, Renner K, Popp V, Gerlach K, Vogel D, Lueckel C, Arnold-Schild D, Pouyssegur J, Kreutz M, Huber M, Koenig J, Weigmann B, Probst HC, von Stebut E, Becker C, Schild H, Schmitt E, Bopp T. Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. *Nat Immunol.* 2018 Dec;19(12):1319-1329.

BULLINGER, L., Döhner, K., & Dohner, H. (2017). Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *Journal of Clinical Oncology*, 35(9), 934–946

CAI, S. F., & Levine, R. L. (2019). Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. *Seminars in Hematology*, 56(2), 84–89.

CARTER, J. L., Hege, K., Yang, J., Kalpage, H. A., Su, Y., Edwards, H., Hüttemann, M., Taub, J. W., & Ge, Y. (2020). Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).

CASSIM S, Vučetić M, Ždravlević M, Pouyssegur J. Warburg and Beyond: The Power of Mitochondrial Metabolism to Collaborate or Replace Fermentative Glycolysis in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 30;12(5):1119.

CHOI JH, Shukla M, Abdul-Hay M. Acute Myeloid Leukemia Treatment in the Elderly: A Comprehensive Review of the Present and Future. *Acta Haematol.* 2023;146(6):431-457.

CORREIA, R. L., Oba-Shinjo, S. M., Uno, M., Huang, N., & Marie, S. K. N. (2011). Mitochondrial DNA depletion and its correlation with TFAM, TFB1M, TFB2M and POLG in human diffusely infiltrating astrocytomas. *Mitochondrion*, 11(1), 48–53.

DANIEL A. Arber, Attilio Orazi, Robert P. Hasserjian, Michael J. Borowitz, Katherine R. Calvo, Hans-Michael Kvasnicka, Sa A. Wang, Adam Bagg, Tiziano Barbui, Susan Branford, Carlos E. Bueso-Ramos, Jorge E. Cortes, Paola Dal Cin, Courtney D. DiNardo, Hervé Dombret, Eric J. Duncavage, Benjamin L. Ebert, Elihu H. Estey, Fabio Facchetti, Kathryn Foucar, Naseema Gangat, Umberto Gianelli, Lucy A. Godley, Nicola Gökbüget, Jason Gotlib, Eva Hellström-Lindberg, Gabriela S. Hobbs, Ronald Hoffman, Elias J. Jabbour, Jean-Jacques Kiladjan, Richard A. Larson, Michelle M. Le Beau, Mignon L.-C. Loh, Bob Löwenberg, Elizabeth Macintyre, Luca Malcovati, Charles G. Mullighan, Charlotte Niemeyer, Olatoyosi M. Odenike, Seishi Ogawa, Alberto Orfao, Elli Papaemmanuil, Francesco Passamonti, Kimmo Porkka, Ching-Hon Pui, Jerald P. Radich, Andreas Reiter, Maria Rozman, Martina Rudelius, Michael R. Savona, Charles A. Schiffer, Annette Schmitt-Graeff, Akiko Shimamura, Jorge Sierra, Wendy A. Stock, Richard M. Stone, Martin S. Tallman, Jürgen Thiele, Hwei-Fang Tien, Alexandar Tzankov, Alessandro M. Vannucchi, Paresh Vyas, Andrew H. Wei, Olga K. Weinberg, Agnieszka Wierzbowska, Mario Cazzola, Hartmut Döhner, Ayalew Tefferi; International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022; 140 (11): 1200–1228.

DAVER, N., Wei, A. H., Pollyea, D. A., Fathi, A. T., Vyas, P., & DiNardo, C. D. (2020). New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter. *Blood Cancer Journal*, 10(10), 1–12.

DE KOUCHKOVSKY, I., & Abdul-Hay, M. (2016). ‘Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update’; *Blood Cancer Journal*, 6, 441.

DESHPANDE, A., Mason, C. E., Goldman, S. L., Hassan, C., Khunte, M., Soldatenko, A., Jong, Y., & Afshinnekoo, E. (2019). Epigenetic Modifications in Acute Myeloid Leukemia.

DI NARDO, C. D., & Cortes, J. E. (2016). Mutations in AML: Prognostic and therapeutic implications. *Hematology*, 2016(1), 348–355.

DÖHNER, H., Wei, A. H., Appelbaum, F. R., Craddock, C., DiNardo, C. D., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Godley, L. A., Hasserjian, R. P., Larson, R. A., Levine, R. L., Miyazaki, Y., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G., Röllig, C., Sierra, J., Stein, E. M., Tallman, M. S., ... Löwenberg, B. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 140(12), 1345–1377

EAVES, C. J. (2015). Hematopoietic stem cells: Concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 125(17), 2605–2613.

EL CHAER F, Hourigan CS, Zeidan AM. How I treat AML incorporating the updated classifications and guidelines. *Blood*. 2023 Jun 8;141(23):2813-2823.

ELENA SÁNCHEZ-MENDOZA, S., & Rego, E. M. (n.d.). Targeting the mitochondria in acute myeloid leukemia. <https://doi.org/10.1186/s41241-017-0022-z>

EL-HATTAB, A. W., Craigen, W. J., & Scaglia, F. (2017). Mitochondrial DNA maintenance defects. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1863, Issue 6, pp. 1539–1555). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.017>

ERDEM, A., Marin, S., Pereira-Martins, D. A., Cortés, R., Cunningham, A., Pruis, M. G., de Boer, B., van den Heuvel, F. A. J., Geugien, M., Wierenga, A. T. J., Brouwers-Vos, A. Z., Rego, E. M., Huls, G., Cascante, M., & Schuringa, J. J. (2022). The Glycolytic Gatekeeper PDK1 defines different metabolic states between genetically distinct subtypes of human acute myeloid leukemia. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28737-3>

ERDEM, A., Marin, S., Pereira-Martins, D. A., Geugien, M., Cunningham, A., Pruis, M. G., Weinhäuser, I., Gerding, A., Bakker, B. M., Wierenga, A. T. J., Rego, E. M., Huls, G., Cascante, M., & Schuringa, J. J. (2022). Inhibition of the succinyl dehydrogenase complex in acute myeloid leukemia leads to a lactate-fuelled respiratory metabolic vulnerability. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29639-0>

ESTEY et al (2017) Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. .

ESTEY, E. H. (2020). Acute myeloid leukemia: 2021 update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, 95(11), 1368–1398. <https://doi.org/10.1002/ajh.25975>

EVANS A, Neuman N. The Mighty Mitochondria. *Mol Cell*. 2016 Mar 3;61(5):641. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.002. PMID: 26942665.

FALKENBERG, M. (2018). Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: Overview of the pathway. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 62, Issue 3, pp. 287– 296). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20170100>

FARUAS, M. G, Castro, S. M. DE (2004). Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40(2): 91– 98

FOOTE, K., Reinhold, J., Yu, E. P. K., Figg, N. L., Finigan, A., Murphy, M. P., & Bennett, M. R. (2018). Restoring mitochondrial DNA copy number preserves mitochondrial function and delays vascular aging in mice. *Aging Cell*, 17(4). <https://doi.org/10.1111/acel.12773>

GARCIAZ, S., Saillard, C., Hicheri, Y., Hospital, M. A., & Vey, N. (2021). Venetoclax in acute myeloid leukemia. Molecular basis, evidences for preclinical and clinical

efficacy and strategies to target resistance. *Cancers*, 13(22), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers13225608>

GIAMPAZOLIAS, E., & Tait, S. W. G. (2016). Mitochondria and the hallmarks of cancer. In *FEBS Journal* (Vol. 283, Issue 5, pp. 803–814). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.13603>

GORELICK AN, Kim M, Chatila WK, La K, Hakimi AA, Berger MF, Taylor BS, Gammage PA, Reznik E. Respiratory complex and tissue lineage drive recurrent mutations in tumour mtDNA. *Nat Metab*. 2021 Apr;3(4):558-570. doi: 10.1038/s42255-021-00378-8. Epub 2021 Apr 8. PMID: 33833465; PMCID: PMC9304985.

GOTO, M., Miwa, H., Suganuma, K., Tsunekawa-Imai, N., Shikami, M., Mizutani, M., Mizuno, S., Hanamura, I., & Nitta, M. (2014). Adaptation of leukemia cells to hypoxic condition through switching the energy metabolism or avoiding the oxidative stress. *BMC Cancer*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14->

GREENBLATT, Sarah Nimer, Stephen 2014. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. 28. 10.1038/leu.2014.94. *Leukemia*

GRØNNINGSÆTER IS, Reikvam H, Aasebø E, Bartaula-Brevik S, Tvedt TH, Bruserud Ø, Hatfield KJ. Targeting Cellular Metabolism in Acute Myeloid Leukemia and The Role of Patient Heterogeneity. *Cells*. 2020 May 7;9(5):1155. doi: 10.3390/cells9051155. PMID: 32392896; PMCID: PMC7290417.

GUERRA, F., Arbini, A. A., & Moro, L. (2017). Mitochondria and cancer chemoresistance. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1858, Issue 8, pp. 686–699). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.012>

GUSTAFSSON, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, N.-G. (2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 133–160. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>

HAAS S, Trumpp A, Milsom MD. Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Cell Stem Cell*. 2018 May 3;22(5):627-638. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.003. PMID: 29727678.

HERST, P. M., Howman, R. A., Neeson, P. J., Berridge, M. V., & Ritchie, D. S. (2011). The level of glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia blasts at diagnosis is prognostic for clinical outcome. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 51–55. <https://doi.org/10.1189/jlb.0710417>

HOSNIJEH, F. S., Lan, Q., Rothman, N., Liu, C. S., Cheng, W. L., Nieters, A., Guldborg, P., Tjønneland, A., Campa, D., Martino, A., Boeing, H., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Krogh, V., Tumino, R., Panico, S., Masala, G., Weiderpass, E., ... Vermeulen, R. (2014). Mitochondrial DNA copy number and future risk of B-cell lymphoma in a nested case-control study in the prospective EPIC cohort. *Blood*, 124(4), 530–535. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532085>

HURWITZ, S. N., Jung, S. K., & Kurre, P. (2020). Hematopoietic stem and progenitor cell signaling in the niche. *Leukemia*, 34(12), 3136–3148. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01062-8>

JONAS, B. A., & Pollyea, D. A. (2019). How we use venetoclax with hypomethylating agents for the treatment of newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 33(12), 2795–2804. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0612-8>

Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). *Metabolism*. 0(July), 607–647.

KAMATH, G. R., Tremblay, D., Coltoff, A., Caro, J., Lancman, G., Bhalla, S., Najfeld, V., Mascarenhas, J., & Taioli, E. (2019). Comparing the epidemiology, clinical characteristics and prognostic factors of acute myeloid leukemia with and without acute promyelocytic leukemia. *Carcinogenesis*, 40(5), 651–660. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz014>

KANSAL, R (2016) Acute myeloid leukemia in the era of precision medicine: recent advances in diagnostic classification and risk stratification. *Cancer Biology and Medicine* 13(1): 41–54

KANTARJIAN, H. M. (2021). Acute Myeloid Leukemia : Treatment and Research Outlook for 2021 and the MD Anderson Approach. <https://doi.org/10.1002/cncr.33477>

KANTARJIAN, H., Kadia, T., DiNardo, C., Daver, N., Borthakur, G., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Konopleva, M., & Ravandi, F. (2021). Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer Journal*, 11(2). <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00425-3>

KEIFFER G, Palmisiano N. Acute Myeloid Leukemia: Update on Upfront Therapy in Elderly Patients. *Curr Oncol Rep*. 2019 Jun 27;21(8):71. doi: 10.1007/s11912-019-0823-1. PMID: 31250135.

KHOURY, J.D., Solary, E., Abla, O. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 36, 1703–1719 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>

KOPINSKI, P.K., Singh, L.N., Zhang, S. et al. Mitochondrial DNA variation and cancer. *Nat Rev Cancer* 21, 431–445 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00358-w>

LACHOWIEZ CA, DiNardo CD, Loghavi S. Molecularly Targeted Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current Treatment Landscape and Mechanisms of Response and Resistance. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 6;15(5):1617. doi: 10.3390/cancers15051617. PMID: 36900407; PMCID: PMC10001191.

LAGADINOU, E. D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R. M., Neering, S. J., Minhajuddin, M., Ashton, J. M., Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K. M., Liesveld, J. L., Brookes, P. S., Becker, M. W., & Jordan, C. T. (2013). BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(3), 329–341. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.013>

LEE C, Kim HN, Kwon JA, Yoon SY, Jeon MJ, Yu ES, Kim DS, Choi CW, Yoon J. Implications of the 5th Edition of the World Health Organization Classification and International Consensus Classification of Myeloid Neoplasm in Myelodysplastic SYNDROME With Excess Blasts and Acute Myeloid Leukemia. *Ann Lab Med.* 2023 Sep 1;43(5):503-507. doi: 10.3343/alm.2023.43.5.503. Epub 2023 Apr 21. PMID: 37080752; PMCID: PMC10151277.

LEONARD JP, Martin P, Roboz GJ. Practical Implications of the 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid and Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017 Aug 10;35(23):2708-2715. doi: 10.1200/JCO.2017.72.6745. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28654364.

LIBERTI, M. V, & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *HHS Public Access. Trends Biochem Sci*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>

LIERSCH R, Müller-Tidow C, Berdel WE, Krug U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use. *Br J Haematol.* 2014 Apr;165(1):17-38. doi: 10.1111/bjh.12750. Epub 2014 Feb 1. PMID: 24484469.

LIESVELD JL (2015) LMA. Acute myelogenous leukemia. In: Prchal JT, Kaushansky K, Lichtman MA, et al., editors.

LINDSLEY, C. R, EBERT, B. (2013) The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies. *Blood* 122(23): 3741–3748.

LIU J, Chen Y, Yu L, Yang L. Mechanisms of venetoclax resistance and solutions. *Front Oncol.* 2022 Oct 12;12:1005659. doi: 10.3389/fonc.2022.1005659. PMID: 36313732; PMCID: PMC9597307.

LIU, L., Patnana, P. K., Xie, X., Frank, D., Nimmagadda, S. C., Rosemann, A., Liebmann, M., Klotz, L., Opalka, B., & Khandanpour, C. (2022). High Metabolic Dependence on Oxidative Phosphorylation Drives Sensitivity to Metformin Treatment in MLL / AF9 Acute Myeloid Leukemia. 1–12.

MACLEAN, A. L., Lo Celso, C., & Stumpf, M. P. H. (2017). Concise Review: Stem Cell Population Biology: Insights from Hematopoiesis. *STEM CELLS*, 35(1), 80– 88. <https://doi.org/10.1002/stem.2508>

MARTINS, D. A. P.-, Coelho-, J. L., Weinhäuser, I., Neto, P. L. F.-, Silveira, D. R., Ortiz, C., Moreira-, A., Lima, M. M., Koury, L. C., Melo, R. A. De, Glória, A. B., Fagundes, E. M., Lino, B. K., Pagnano, K., Bittencourt, R., Nunes, E., Traina, F., Figueiredo-, L., Fazi, P., ... Lucena-, A. R. (2022). Clinical significance of mitochondrial DNA content in acute promyelocytic leukaemia. August, 1–5. <https://doi.org/10.1111/bjh.18510>

MEDINGER M, Lengerke C, Passweg J. Novel therapeutic options in Acute Myeloid Leukemia. *Leuk Res Rep.* 2016 Oct 1;6:39-49. doi: 10.1016/j.lrr.2016.09.001. PMID: 27752467; PMCID: PMC5061308.

MESBAHI, Y., Trahair, T. N., Lock, R. B., & Connerty, P. (2022). Exploring the Metabolic Landscape of AML: From Haematopoietic Stem Cells to Myeloblasts and Leukaemic Stem Cells. *Frontiers in Oncology*, 12(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.807266>

MISHRA SK, Millman SE, Zhang L. Metabolism in acute myeloid leukemia: mechanistic insights and therapeutic targets. *Blood*. 2023 Mar 9;141(10):1119-1135. doi: 10.1182/blood.2022018092. PMID: 36548959; PMCID: PMC10375271.

MISHRA, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379–387. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>

MOHAMED Jiffry MZ, Kloss R, Ahmed-Khan M, Carmona-Pires F, Okam N, Weeraddana P, Dharmaratna D, Dandwani M, Moin K. A review of treatment options employed in relapsed/refractory AML. *Hematology*. 2023 Dec;28(1):2196482. doi: 10.1080/16078454.2023.2196482. PMID: 37036019.

MOSCHOI R, Imbert V, Nebout M, et al (2016) Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 128(2):253–64.

NAKAMURA-ISHIZU, A., Ito, K., & Suda, T. (2020). Hematopoietic Stem Cell Metabolism during Development and Aging. *Developmental Cell*, 54(2), 239–255. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.029>

NUNES, A. de L., Paes, C. de A., Murao, M., Viana, M. B., & De Oliveira, B. M. (2019). Cytogenetic abnormalities, WHO classification, and evolution of children and adolescents with acute myeloid leukemia. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 41(3), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.09.007>

ORKIN SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):631-44. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.025. PMID: 18295580; PMCID: PMC2628169.

PAPAEMMANUIL, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., Potter, N. E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D. R., ... Campbell, P. J. (2016). Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(23), 2209–2221. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>

PASQUER H, Tostain M, Kaci N, Roux B, Benajiba L. Descriptive and Functional Genomics in Acute Myeloid Leukemia (AML): Paving the Road for a Cure. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 11;13(4):748. doi: 10.3390/cancers13040748. PMID: 33670178; PMCID: PMC7916915.

PELCOVITS, A. R. I., & Niroula, R. (2020). Acute Myeloid Leukemia : A Review. April, 38–40.

PELCOVITS, A., & Niroula, R. (n.d.). Acute Myeloid Leukemia: A Review. Retrieved April 15, 2020, from <https://seer.cancer.gov/statfacts/>

PERONI E, Randi ML, Rosato A, Cagnin S. Acute myeloid leukemia: from NGS, through scRNA-seq, to CAR-T. dissect cancer heterogeneity and tailor the treatment. *J Exp CLIN Cancer Res.* 2023 Oct 6;42(1):259. doi: 10.1186/s13046-023-02841-8. PMID: 37803464; PMCID: PMC10557350.

POTTER, M., Newport, E., & Morten, K. J. (2016). The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1499–1505. <https://doi.org/10.1042/BST20160094>

POTTER, N., Miraki-Moud, F., Ermini, L. et al. Single cell analysis of clonal architecture in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 33, 1113–1123 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0319-2>

PRADA-ARISMENDY J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2017 Jan;31(1):63-76. doi: 10.1016/j.blre.2016.08.005. Epub 2016 Sep 2. PMID: 27639498.

PRESTI, C. Lo, Fauvelle, F., Jacob, M. C., Mondet, J., & Mossuz, P. (2021). The metabolic reprogramming in acute myeloid leukemia patients depends on their genotype and is a prognostic marker. *Blood Advances*, 5(1), 156–166. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002981>

RAFFEL S, Klimmeck D, Falcone M, Demir A, Pouya A, Zeisberger P, Lutz C, Tinelli M, Bischel O, Bullinger L, Thiede C, Flörcken A, Westermann J, Ehninger G, Ho AD, Müller-Tidow C, Gu Z, Herrmann C, Krijgsveld J, Trumpp A, Hansson J. Quantitative proteomics reveals specific metabolic features of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood.* 2020 Sep 24;136(13):1507-1519. doi: 10.1182/blood.2019003654. PMID: 32556243.

RASHKOVAN, M., & Ferrando, A. (2019). Metabolic dependencies and vulnerabilities in leukemia. *Genes & Development*, 33(21–22), 1460–1474. <https://doi.org/10.1101/gad.326470.119>

ROSE-INMAN, H, Kuehl, D (2014) Acute leukemia. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32(3): 579–596,

SAITO, K., Zhang, Q., Yang, H., Yamatani, K., Ai, T., Ruvolo, V., Baran, N., Cai, T., Ma, H., Jacamo, R., Kuruvilla, V., Imoto, J., Kinjo, S., Ikeo, K., Moriya, K., Suzuki, K., Miida, T., Kim, Y., Vellano, C. P., ... Konopleva, M. (2021). Exogenous mitochondrial transfer and endogenous mitochondrial fusion facilitate AML resistance to OxPhos inhibition. *5(20)*, 4233–4255. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003661>.  
The Saultz, J. N., & Garzon, R. (n.d.)(2016). *Clinical Medicine Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review.* <https://doi.org/10.3390/jcm5030033>

SHAMAS-Din, A., Minden, M. D., Bader, G. D., Laposa, R., & Schimmer, A. D. (2017). Leveraging increased cytoplasmic nucleoside kinase activity to target mtDNA and

oxidative phosphorylation in AML. *Blood*, 129(19), 2657–2666. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-741207>

SHARMA P, Borthakur G. Targeting metabolic vulnerabilities to overcome resistance to therapy in acute myeloid leukemia. *Cancer Drug Resist.* 2023 Aug 17;6(3):567-589. doi: 10.20517/cdr.2023.12. PMID: 37842232; PMCID: PMC10571063.

SHARMA P, Sampath H. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells.* 2019 Jan 29;8(2):100. doi: 10.3390/cells8020100. PMID: 30700008; PMCID: PMC6406942.

SHARMA, N., Pasala, M. S., & Prakash, A. (2019). Mitochondrial DNA: Epigenetics and Environment HHS Public Access. *Environ Mol Mutagen*, 60(8), 668–682. <https://doi.org/10.1002/em.22319>

SHARMA, P., & Sampath, H. (2019). Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells*, 8(2), 100. <https://doi.org/10.3390/cells8020100>

SHLUSH, L. I., & Mitchell, A. (2015). AML evolution from preleukemia to leukemia and relapse. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 28(2–3), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2015.10.004>

SHORT, N. J., Konopleva, M., Kadia, T. M., Borthakur, G., Ravandi, F., Dinardo, C. D., & Daver, N. (2020). Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia : New Drugs and New Challenges. *April*, 506–525. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1011>

SPIEKERMANN K, Shen AS. Akute myeloische Leukämie bei Erwachsenen [AML in Adults - An Update on Diagnosis, Risk Classification and Therapy]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2018 Sep;143(18):1297-1303. German. doi: 10.1055/s-0043-121022. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30199909.

STUANI L, Sabatier M, Saland E, Cognet G, Poupin N, Bosc C, Castelli FA, Gales L, Turtoi E, Montersino C, Farge T, Boet E, Broin N, Larrue C, Baran N, Cissé MY, Conti M, Loric S, Kaoma T, Hucteau A, Zavoriti A, Sahal A, Mouchel PL, Gotanègre M, Cassan C, Fernando L, Wang F, Hosseini M, Chu-Van E, Le Cam L, Carroll M, Selak MA, Vey N, Castellano R, Fenaille F, Turtoi A, Cazals G, Bories P, Gibon Y, Nicolay B, Ronseaux S, Marszalek JR, Takahashi K, DiNardo CD, Konopleva M, Pancaldi V, Collette Y, Bellvert F, Jourdan F, Linares LK, Récher C, Portais JC, Sarry JE. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2021 May 3;218(5):e20200924. doi: 10.1084/jem.20200924. PMID: 33760042; PMCID: PMC7995203.

SUGANUMA, K., Miwa, H., Imai, N., Shikami, M., Gotou, M., Goto, M., Mizuno, S., Takahashi, M., Yamamoto, H., Hiramatsu, A., Wakabayashi, M., Watarai, M., Hanamura, I., Imamura, A., Mihara, H., & Nitta, M. (2010). Energy metabolism of leukemia cells: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia and Lymphoma*, 51(11), 2112–2119. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.512966>

TALLMAN, M. S et al (2019) Acute myeloid leukemia. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 17(6): 721–749.

UDDIN, R., Darwish, N. H. E., & Mousa, S. A. (2021). Acute Myeloid Leukemia Mutations and Future Mechanistic Target to Overcome Resistance. <https://doi.org/10.1007/s11864-021-00880-x>

VAN GASTEL N, Spinelli JB, Sharda A, Schajnovitz A, Baryawno N, Rhee C, Oki T, Grace E, Soled HJ, Milosevic J, Sykes DB, Hsu PP, Vander Heiden MG, Vidoudez C, Trauger SA, Haigis MC, Scadden DT. Induction of a Timed Metabolic Collapse to Overcome Cancer Chemoresistance. *Cell Metab.* 2020 Sep 1;32(3):391-403.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.07.009. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32763164; PMCID: PMC8397232.

VIGIL, A. M. A, Miranda, L. L.H (2019) Molecular biology in the diagnostic of acute myeloid leukemia. *Revista Cubana de Hematologia, Inmunologia y Hemoterapia* 35(3): 1–12.

VILLANI AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S, Jardine L, Dixon D, Stephenson E, Nilsson E, Grundberg I, McDonald D, Filby A, Li W, De Jager PL, Rozenblatt-Rosen O, Lane AA, Haniffa M, Regev A, Hacohen N. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017 Apr 21;356(6335):eaah4573. doi: 10.1126/science.aah4573. PMID: 28428369; PMCID: PMC5775029.

WALLACE L, Obeng EA. Noncoding rules of survival: epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Front Mol Biosci.* 2023 Oct 31;10:1273046. doi: 10.3389/fmolb.2023.1273046. PMID: 38028538; PMCID: PMC10644717.

WEINBERG OK, Sohani AR, Bhargava P, Nardi V. Diagnostic work-up of acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2017 Mar;92(3):317-321. doi: 10.1002/ajh.24648. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28066929.

WU S, Fahmy N, Alachkar H (2019) The mitochondrial transcription machinery genes are upregulated in acute myeloid leukemia and associated with poor clinical outcome. *Metabolism Open* 2: 100009, May.

YAN, Duanmu, Zeng, Liu, & Song. (2019). Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*, 8(4), 379. <https://doi.org/10.3390/cells8040379>

YEHUDAI D, Liyanage SU, Hurren R, Rzoska B, Albertella M, Gronda M, Jeyaraju DV, Wang X, Barghout SH, MacLean N, Siriwardena TP, Jitkova Y, Targett-Adams P, Schimmer AD. The thymidine dideoxynucleoside analog, alovudine, inhibits the mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ , impairs oxidative phosphorylation and promotes monocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2019 May;104(5):963-972. doi: 10.3324/haematol.2018.195172. Epub 2018 Dec 20. PMID: 30573504; PMCID: PMC6518883.

YILMAZ, M., Wang, F., Loghavi, S., Bueso-Ramos, C., Gumbs, C., Little, L., Song, X., Zhang, J., Kadia, T., Borthakur, G., Jabbour, E., Pemmaraju, N., Short, N., Garcia-

Manero, G., Estrov, Z., Kantarjian, H., Futreal, A., Takahashi, K., & Ravandi, F. (2019). Late relapse in acute myeloid leukemia (AML): clonal evolution or therapy-related leukemia? *Blood Cancer Journal*, 9(2), 3–8. <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0170-3>

YOU, R., Wang, B., Chen, P., Zheng, X., Hou, D., Wang, X., Zhang, B., Chen, L., Li, D., Lin, X., & Huang, H. (2022). Metformin sensitizes AML cells to chemotherapy through blocking mitochondrial transfer from stromal cells to AML cells. *Cancer Letters*, 532, 215582. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215582>

ZHANG, P., Sui, P., Chen, S., Guo, Y., Li, Y., Ge, G., Zhu, G., Yang, H., Rogers, C. M., Sung, P., Nimer, S. D., Xu, M., & Yang, F. C. (2021). INTS11 regulates hematopoiesis by promoting PRC2 function. *Science Advances*, 7(36), 1–17. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh1684>

ZHOU, F., Zeng, C., Kuang, W., Cheng, C., & Liu, H. (2021). Metformin exerts a synergistic effect with venetoclax by downregulating Mcl-1 protein in acute myeloid leukemia. 12. <https://doi.org/10.7150/jca.60208>

## APÊNDICE A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA (CEP)

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** Antonio Roberto Lucena de Araujo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 77527717.4.3001.5195

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco -

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

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.644.746

#### Apresentação do Projeto:

Esse projeto tem como objetivo avaliar o perfil genético de pacientes adultos com leucemia mieloide aguda, incluindo mutações/polimorfismos de genes (NPM1, FLT3, CEBPA, WT1, MLL, IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1, TP53), expressões aberrantes de genes (BAALC, ERG, EVI1, KMT2E, ID1 e MN1) e alterações no número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA), bem como o impacto prognóstico dessas alterações nos principais

desfechos clínicos da doença (remissão, recaída e morte). Para isso, pretende-se incluir um total de 300 pacientes diagnosticados e acompanhados no Hospital de Hematologia e Hemoterapia da Fundação Hemope, no Hospital do Câncer de Pernambuco e no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira. Para as análises de expressão gênica e do número de cópias de mtDNA, serão utilizadas, como controle

saudável, amostras de sangue periférico e medula óssea de 20 indivíduos saudáveis. Entende-se por indivíduo saudável aquele que não apresentar nenhuma doença hematológica ou oncológica e, para essa análise, será necessário avaliar os prontuários dos pacientes selecionados. Esses indivíduos serão pacientes acompanhados no ambulatório do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HCPE) e que serão submetidos à cirurgia ortopédica em que a crista ilíaca esteja sendo abordada.

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171  
**Bairro:** Graças **CEP:** 52.011-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3182-4771 **Fax:** (81)3182-4660 **E-mail:** osp.hemope@gmail.com

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO



Continuação do Parecer: 2.644.798

**Objetivo da Pesquisa:**

Esse projeto tem como objetivo avaliar o perfil genético de pacientes adultos com leucemia mieloide aguda, incluindo mutações/polimorfismos de genes (NPM1, FLT3, CEBPA, WT1, MLL, IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1, TP53), expressões aberrantes de genes (BAALC, ERG, EVI1, KMT2E, ID1 e MN1) e alterações no número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA), bem como o impacto prognóstico dessas alterações nos principais desfechos clínicos da doença (remissão, recaída e morte).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** A possibilidade de causar uma situação desconfortável ao paciente devido ao convite para participar da pesquisa. Caso essa situação aconteça, ela será rapidamente contornada visto que a participação ou não do paciente na pesquisa não influenciará no seu tratamento e será explicado a importância do estudo para o refinamento da estratificação de risco dos pacientes e das condutas terapêuticas. Em nenhuma ocasião será coletado material extra para uso da pesquisa. Para os indivíduos saudáveis que entrarão na pesquisa como controle, o procedimento de aspiração de medula óssea, de no máximo 5ml, será realizado nos pacientes que serão

submetidos à retirada de enxerto do ilíaco para tratamento de eventuais doenças ortopédicas, no mesmo sítio cirúrgico de retirada do enxerto. Será

realizada pelo médico cirurgião que estiver realizando a cirurgia ortopédica em bloco cirúrgico no Hospital das Clínicas de Pernambuco. Essa punção não agregará risco adicional além dos inerentes à cirurgia de retirada do enxerto, indicada devido à doença ortopédica do paciente. A coleta do sangue periférico será a mesma realizada para os exames pré-operatórios, sendo acrescentado apenas um tubo a mais de 4 mL, que será encaminhado para a pesquisa. Dessa forma, não será acrescentado risco ou morbidade aos procedimentos que já serão realizados para o procedimento cirúrgico.

**Benefícios:** Os indivíduos incluídos nesse estudo estarão contribuindo para o desenvolvimento dessa pesquisa que traz como benefícios entender melhor o desenvolvimento da LMA e possibilitar uma maior acurácia no estabelecimento do prognóstico e, conseqüentemente, da indicação terapêutica dos pacientes com LMA, aumentando as chances de cura. Apesar de a pesquisa de algumas destas mutações serem preconizadas pela OMS na rotina de diagnóstico, o alto custo destes exames muitas vezes inviabiliza sua realização nas instituições públicas ou por custeio próprio do paciente. Nesse contexto, o projeto propõe realizar os testes em questão e fornecer os laudos à equipe dos hospitais envolvidos e aos pacientes que forem

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171  
**Bairro:** Grapes **CEP:** 52.011-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3182-4771 **Fax:** (81)3182-4660 **E-mail:** csp.hemope@gmail.com

**FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO**



Continuação do Parecer: 2.644.746

incluídos na pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa em questão é bastante relevante para população e comunidade científica visto que se pretende definir um painel com as principais mutações que podem definir o prognóstico dos pacientes com LMA em Pernambuco.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos e documentações foram apresentados e estão de acordo com as normas éticas.

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Considero este projeto aprovado por este Comitê.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1046527.pdf	16/04/2018 10:55:52		Aceito
Outros	Carta_resposta_ao_Comite_de_Etica_Hemope.docx	16/04/2018 10:47:34	Antonio Roberto Lucena de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_FINAL_Antonio_Roberto_Corrigido_HEMOPE.docx	16/04/2018 10:47:01	Antonio Roberto Lucena de Araujo	Aceito
Outros	Carta_resposta_ao_Comite_de_Etica.docx	24/11/2017 19:25:42	Antonio Roberto Lucena de Araujo	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_Aggeu_assinada.pdf	24/11/2017 19:23:18	Antonio Roberto Lucena de Araujo	Aceito
Outros	Autorizacao_de_uso_de_dados_Hemop_e_carimbada_e_assinada.pdf	24/11/2017 19:22:19	Antonio Roberto Lucena de Araujo	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_do_Hemope_assinada_e_carimbada.pdf	24/11/2017 19:20:39	Antonio Roberto Lucena de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_FINAL_Antonio_Roberto_Corrigido.docx	24/11/2017 19:19:40	Antonio Roberto Lucena de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_paciente_modificado.doc	24/11/2017 19:19:17	Antonio Roberto Lucena de Araujo	Aceito

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171  
 Bairro: Graças CEP: 52.011-000  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)3182-4771 Fax: (81)3182-4660 E-mail: cep.hemope@gmail.com

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO



Continuação do Parecer: 2.644.740

Outros	ma.pdf	21:03:15	Lucena de Araujo	Aceito
--------	--------	----------	------------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 09 de Maio de 2018

---

**Assinado por:**  
**Maria Iraci Buarque Valença**  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171  
**Bairro:** Graças **CEP:** 52.011-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3182-4771 **Fax:** (81)3182-4660 **E-mail:** osp.homope@gmail.com

## **ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

### *TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)*

#### **MAIORES DE 18 ANOS**

#### **(resolução 466/12)**

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa "Determinação do número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) na Leucemia Mieloide Aguda" que está sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar (Fone: (81) 9.98018899 – E-mail: [amandamoreira98@gmail.com](mailto:amandamoreira98@gmail.com)) e sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 9.9159-4676 - [araujoarl@hotmail.com](mailto:araujoarl@hotmail.com)) e Msc. Pedro Luiz de França neto (Fone: 81 9666-1908 – [pedro.neto229@gmail.com](mailto:pedro.neto229@gmail.com)). Também participam desta pesquisa: Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 9.9800- 8105 - [macbezerra@bol.com.br](mailto:macbezerra@bol.com.br)).

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

As neoplasias hematológicas são cânceres das células do sangue. Essas doenças afetam crianças e adultos impedindo a boa funcionalidade das células sanguíneas, causando anemia, alterações nos glóbulos brancos, e sangramento. De curso clínico muitas vezes agressivo. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas levava ao melhor entendimento da doença contribuindo para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e prognósticas aumentando a qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 ml de sangue,

obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

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

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

---

(Assinatura do pesquisador)

**Determinação do número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) na Leucemia Mieloide Aguda**

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO**

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

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

\_\_\_\_\_ Assinatura do  
participante

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: