Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARCELA TEMPORAL BESSONI

O IMPACTO DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRANSCRICIONAIS EM RNA MENSAGEIRO NA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Recife
2024

MARCELA TEMPORAL BESSONI

O IMPACTO DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRANSCRICIONAIS EM RNA MENSAGEIRO NA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.
Orientador: Msc. Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Bessoni, Marcela Temporal .
O impacto de modificações pós-transcricionais em RNA mensageiro na leucemia mieloide aguda / Marcela Temporal Bessoni. - Recife, 2024.
73 p. : il., tab.

Orientador(a): Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar
Coorientador(a): Antonio Roberto Lucena de Araújo
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.
Inclui referências.

1. Leucemia Mieloide Aguda. 2. Genética. 3. Epitranscriptômica. I. Aguiar, Amanda Moreira Gonçalves de. (Orientação). II. Araújo, Antonio Roberto Lucena de. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

MARCELA TEMPORAL BESSONI

O IMPACTO DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRANSCRICIONAIS EM RNA MENSAGEIRO NA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 09/10/2024

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientador: Msc. Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar
UFPE/ Laboratório Central do Centro de Biociências

_____

Dr. Pedro Luiz de França Neto
UFPE/ Departamento de Genética

_____

Msc. Gabriela da Silva arcanjo
UFPE/ Laboratório Central do Centro de Biociências

Dedico este trabalho a minha família, meus amigos, e a todos que contribuíram para que eu chegasse onde cheguei. Obrigada, de coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha Orientadora, Amanda Moreira, que me encorajou do início ao fim, e que é sinônimo de resiliência e me incentiva a seguir minha trajetória como profissional, apesar de todas as adversidades que encontre pelo caminho. Ao meu coorientador, Antonio Roberto, e meu grupo de pesquisa, composto por Juan, Peu, Márcio, Vitória, Bruna, Lidiane e Isabelle, por serem uma parte tão importante no meu desenvolvimento não só enquanto aluna, mas principalmente enquanto pessoa. Obrigada pela oportunidade de fazer parte disso com vocês. Agradeço especialmente à Malu, minha mãe científica, que me ensinou boa parte do que sei hoje, e de quem sinto falta todos os dias no Labcen.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao departamento de Biofísica e Radiobiologia, bem como ao Laboratório Central do Centro de Biociências, por proporcionar a estrutura necessária para realização das atividades cotidianas.

Agradeço a meus pais, Getulio e Myriam, e minha madrasta Ane, por todo o apoio, amor, confiança, carinho e orgulho que fazem questão de demonstrar diariamente. Sem vocês não seria quem sou hoje. Amo vocês imensamente. Ao meu irmão Bruno, minha cunhada Carol e meus sobrinhos Pedro, Vinicius e Clara, que mesmo tão distantes se fazem tão presentes e deixam meu coração quentinho de saudades. À Ana Laura, com quem tenho a alegria de dividir meus dias e me faz a mulher mais feliz desse mundo. Te amo demais meu amor, obrigada por tudo.

Às minhas amigas de faculdade que transformaram-se em verdadeiros refúgios nesses 4 anos, Clara e Joyce. Sou extremamente grata pela parceria, cumplicidade e por todas as risadas, reclamações e apoio ao longo desses anos. À Vanessa, Laíza e Myllena, que apesar de terem cruzado meu caminho tão recentemente, parece que nos conhecemos há anos. Tenho orgulho de ter contribuído com uma ínfima parte da formação de vocês, e sou extremamente grata pelo carinho e confiança que vocês depositam em mim. Não podia pedir por melhores colegas de profissão para ter ao meu lado.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos de vida Mariana, Afonso, Daniele, Gustavo e Davi, com quem tenho o prazer de compartilhar os meus melhores e piores momentos. Obrigada por me acompanharem desde sempre e por serem meu porto seguro. Amo todos vocês.

O Cosmos e seus sonhos infinitos. Nós somos o Cosmos sonhando a si mesmo. É apenas um sonho que eu penso ser minha vida, todas as vezes.

– Mike Flanagan

BESSONI, Marcela Temporal. **O impacto de modificações pós-transcricionais em RNA mensageiro na Leucemia Mieloide Aguda**. 2024. 73 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é um grupo de neoplasias hematológicas heterogêneas que afeta progenitores hematopoéticos, prejudicando a produção de células maduras e funcionais da linhagem mieloide devido a anormalidades na diferenciação celular. Apesar de seu caráter multifatorial, apresenta um panorama genético complexo considerado preponderante para o fenótipo leucêmico. Tratamentos medicamentosos como a quimioterapia padrão costumam ser utilizados, mas nem todos os pacientes apresentam uma boa resposta, principalmente devido à heterogeneidade clínica, molecular e citogenética da doença. O transplante de medula óssea (TMO), terapia curativa da doença, também possui limitações devido à condições do paciente e questões de infraestrutura. Por essa razão, é necessária a busca por novos alvos terapêuticos, com a finalidade de identificar tratamentos mais eficientes e específicos. Dessa forma, pesquisas recentes exploram reguladores epigenéticos no processo de transformação e progressão da LMA, focando em modificações pós-transcricionais de RNA mensageiro (mRNA), tais como metilações, acetilações e desaminações, que afetam a estabilidade, splicing alternativo e tradução de genes. Assim, o presente estudo pretendeu analisar, compilar e descrever essas modificações pós-transcricionais em mRNA, e sua relação com a LMA, por meio da seleção das alterações descritas na literatura, avaliando sua associação com a doença e os mecanismos relacionados ao fenótipo leucêmico. Foi elaborada uma revisão de literatura integrativa, selecionando os artigos relevantes que apontam uma relação entre as modificações em mRNA e a LMA. Desse modo, através da análise de 27 artigos científicos, foram identificadas as principais alterações em mRNA associadas à doença, elucidando as vias comprometidas e seu papel na progressão ou manutenção da LMA. A avaliação de cinco tipos de modificação (m6a, m5c, m7g, ac4c e A-to-I) indicou que a intensificação do processo pode estar relacionada tanto ao aumento quanto diminuição dos alvos específicos, dessa forma impactando positivamente ou negativamente no fenótipo leucêmico. Alterações em vias celulares relacionadas ao metabolismo, diferenciação, proliferação, manutenção do microambiente medular, mecanismo de ação de fármacos e apoptose foram evidenciadas. Para alguns alvos, no entanto, apesar de mostrarem variações na sua expressão e possuírem uma relação estatística com parâmetros referentes ao curso da doença, seus mecanismos de contribuição para esses efeitos ainda não foram identificados. Assim, faz-se necessária a continuidade dos estudos de cada uma das modificações para ampliação do conhecimento acerca dos seus efeitos na LMA.

Palavras-chave: Epitranscriptômica. LMA. Metilação. Acetilação. mRNA.

BESSONI, Marcela Temporal. **The impact of post-transcriptional modifications in the mRNA in Acute Myeloid Leukemia**. 2024. 73 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a group of heterogeneous hematologic neoplasms affecting hematopoietic progenitors, impairing the production of mature and functional myeloid lineage cells due to abnormalities in cellular differentiation. Despite its multifactorial nature, AML presents a complex genetic profile that is considered a major determinant of the leukemic phenotype. Standard chemotherapy treatments are commonly used, yet not all patients respond well, mainly due to the clinical, molecular, and cytogenetic heterogeneity of the disease. Bone marrow transplant (BMT), a curative therapy for AML, also has limitations due to patient conditions and infrastructure issues. For this reason, there is a need to identify new therapeutic targets to discover more efficient and specific treatments. Recent research thus explores epigenetic regulators in the transformation and progression of AML, focusing on post-transcriptional modifications of messenger RNA (mRNA), such as methylations, acetylations, and deaminations, which affect gene stability, alternative splicing, and translation. This study aimed to analyze, compile, and describe these post-transcriptional mRNA modifications and their relationship with AML by selecting relevant changes described in the literature, evaluating their association with the disease and mechanisms linked to the leukemic phenotype. An integrative literature review was conducted, selecting relevant articles that point to a relationship between mRNA modifications and AML. Through the analysis of 27 scientific articles, the main mRNA alterations associated with the disease were identified, elucidating the compromised pathways and their role in AML progression or maintenance.The assessment of five types of modification (m6A, m5C, m7G, ac4C, and A-to-I) indicated that the intensification of these processes could relate to either an increase or decrease of specific targets, thus impacting the leukemic phenotype positively or negatively. Alterations in cellular pathways related to metabolism, differentiation, proliferation, bone marrow microenvironment maintenance, drug action mechanisms, and apoptosis were highlighted. However, for some targets, although variations in their expression were observed and statistically linked to disease progression parameters, their mechanisms of contribution to these effects remain unidentified. Thus, further studies are required to expand knowledge about each modification’s effects on AML.

Key words: Epitranscriptomics. AML. Methylation. Acetylation. mRNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo hierárquico da hematopoiese..... 15
Figura 2 – Distribuição das leucemias estimadas para o ano de 2023 no Brasil.... 18
Figura 3 – Diagrama de Venn das classes mutacionais da LMA..... 20
Figura 4 – Maquinaria funcional da m6a..... 30
Figura 5 – Dinâmica da modificação m5c..... 34
Figura 6 – Modelo esquemático da maquinaria funcional da m7g..... 35
Figura 7 – Mecanismo de ação da NAT10..... 37
Figura 8 – Modificação Adenosina-Inosina..... 39
Figura 9 – Fluxograma da metodologia empregada no estudo..... 42
Figura 10 – Modelo de ação do mecanismo m5c na estrutura da cromatina..... 49
Figura 11 – Mecanismo de contribuição da TET2 para o fenótipo leucêmico..... 50
Figura 12 – Mecanismo pró-apoptótico mediado pela redução de NAT10..... 53
Figura 13 – Edição dos alvos COG3 e COPA pela ADAR2..... 55
Figura 14 – Atividade do METTL16 sob os alvos BCAT1 e BCAT2..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Incidência de Leucemias Mieloides no Brasil..... 18
Tabela 2 – Critérios diagnósticos..... 22
Tabela 3 – Classificação OMS 2016/2022.....24
Tabela 4 – Estratificação de Risco ELN 2022..... 27
Tabela 5 – Síntese das informações principais de cada modificação.....40
Tabela 6 – Enumeração dos artigos selecionados.....43

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 14

1.1 HEMATOPOIESE..... 14

1.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA..... 16

1.2.1 Epidemiologia..... 17

1.2.2 Fisiopatologia..... 19

1.2.3 Diagnóstico e Classificação..... 21

1.2.4 Estratificação de Risco e Tratamento..... 25

1.3 MODIFICAÇÕES PÓS-TRANSCRICIONAIS EM RNA MENSAGEIRO..... 27

1.3.1 Modificação N6-Metiladenosina- m6a..... 28

1.3.2 Modificação N5-Metilcitidina- m5c..... 32

1.3.3 Modificação N7-Metilguanosina- m7g..... 34

1.3.4 Modificação N4-Acetilcitidina- ac4c..... 36

1.3.5 Modificação Adenosina-Inosina- A-to-I..... 37

2 OBJETIVOS..... 41

2.1 OBJETIVOS GERAIS..... 41

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 41

3 METODOLOGIA..... 42

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 43

5 CONCLUSÃO..... 59

REFERÊNCIAS..... 60

Introdução

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é um conjunto de neoplasias hematológicas que consiste na infiltração de células clonais da linhagem mieloide pouco ou anormalmente diferenciadas na medula óssea, sangue periférico e em outros tecidos (Dohner et al., 2015). Estas células, chamadas blastos leucêmicos, vão gradualmente substituindo a hematopoiese normal por uma hematopoiese leucêmica e ineficaz, onde as células maduras da linhagem mieloide se encontram comprometidas, comprometendo a medula óssea e levando a um quadro de anemia e plaquetopenia severos (Passegué et al., 2003; Cavalcanti et al., 2020). Bem como a maioria dos cânceres humanos, é uma patologia multifatorial, em que mutações em determinados genes podem acarretar em um melhor ou pior prognóstico para o paciente. O status mutacional dos genes *NPM1, FLT3 e CEBPA* é a avaliação prognóstica utilizada na prática clínica atualmente (Dohner et al., 2015).

Além disso, translocações importantes foram descritas e são frequentemente detectadas na LMA. Tais translocações promovem a formação de um gene de fusão que interfere no funcionamento normal de vias relacionadas a diferenciação, divisão celular e apoptose, por exemplo, e são utilizadas para diagnóstico da doença por citogenética e biologia molecular (Dohner et al., 2022). No entanto, cerca de 45% dos pacientes não apresentam as chamadas alterações genéticas recorrentes, que seriam componentes genéticos categóricos que notoriamente estimulam um fenótipo leucêmico, o que enfatiza a provável participação de mecanismos ainda não elucidados (Silva; Conceição, 2022).

O tratamento padrão, utilizado para a maioria dos pacientes, é a quimioterapia no protocolo “3+7” (7 dias de citarabina e 3 dias de uma antraciclina – geralmente a daunorrubicina) (Dohner et al., 2015), mas por causa da variedade de respostas, a sobrevida global média dos pacientes não ultrapassa 10 meses (Sasaki et al., 2022). A terapia curativa realizada atualmente é o Transplante de Medula Óssea (TMO); porém, a realidade brasileira e a infraestrutura do sistema de saúde dificultam a viabilidade do TMO, por se tratar de um país em desenvolvimento (Almeida et al., 2022). A baixa taxa de sobrevida dos pacientes é reflexo de uma enorme heterogeneidade clínica da doença, que é explicada por sua diversidade molecular e citogenética, além da idade avançada apresentada por grande parte dos acometidos pela LMA (Dohner et al., 2015). Nesse sentido, novas pesquisas buscam esclarecer e identificar novos mecanismos moleculares envolvidos com a

LMA, a fim de estabelecer alvos terapêuticos que contribuam com o sucesso do tratamento e aumento da sobrevida dos pacientes.

Estudos recentes mostram que reguladores epigenéticos estão envolvidos no processo de transformação do estado pré-leucêmico para leucêmico, além de contribuir com a progressão da doença através do bloqueio de diferenciação (Qing et al., 2021) e resistência a apoptose (Xu et al., 2021). Tais modificações podem afetar o DNA, proteínas histonas e os diversos tipos de RNA, como mRNA, tRNA, rRNA, lncRNA, circRNA, miRNA, entre outros (Issah et al., 2021), e se caracterizam principalmente como metilação, acetilação e desaminação em diferentes bases nitrogenadas (Arzumanian et al., 2022). As modificações pós-transcricionais em mRNA são um exemplo emergente de regulação epigenética, onde os genes alvo dessas modificações sofrem um aumento ou diminuição de estabilidade, induzindo splicing alternativo e modificando o ritmo de tradução (Arzumanian et al., 2022).

Por causa do papel decisivo que modificações em mRNA podem exercer na síntese de proteínas, é relevante avaliar e elucidar seus mecanismos no contexto da LMA. Pesquisas apontam que genes relacionados à progressão da LMA são alvo de modificações como m6a, m7g, ac4c, A-to-I e m5c (Rosselló-Tortella; Ferrer; Estreller, 2020). Assim, torna-se favorável a seleção e reunião de tais alterações para conjecturar suas participações no fenótipo da doença, com a finalidade de fornecer um apanhado dos principais mecanismos descritos na literatura.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 HEMATOPOIESE

A hematopoiese é o processo hierarquizado e contínuo que tem como objetivo a geração, manutenção e diferenciação de todas as linhagens celulares presentes no sangue. Se inicia ainda no período embrionário, com uma “fase primitiva” regida primeiramente por estruturas contidas no saco vitelínico, num processo que origina apenas eritrócitos, necessários para a oxigenação autônoma do embrião. Após esse primeiro momento, a hematopoiese é, então, transferida para células da mesoderme (Aorta-Gônadas-Mesonefro), onde ocorre a chamada “fase definitiva”, em que se origina a célula tida como ponto comum de todas as linhagens: a célula tronco hematopoética (CTH) ou, do inglês, *hematopoietic stem cell* (HSC) (Calvanese; Mikkola, 2023). Em estágios mais avançados do desenvolvimento fetal, a hematopoiese é assumida pelo baço e fígado, e a partir do terceiro mês de vida, a medula óssea (MO) assume a produção celular, exercendo também um papel de regulação através de seu microambiente favorável, composto por células e fatores de crescimento que auxiliam na diferenciação, sobrevivência e maturação de progenitores e linhagens (Lacaud; Kouskoff, 2017) (Pinho; Frenette, 2019).

As CTHs são células pluripotentes, encontradas em baixa frequência na MO, que desfrutam de alta capacidade de renovação, mas numa baixa taxa de proliferação. Esse potencial é garantido pela existência de dois nichos ou “pools” principais de CTHs: células tronco de vida-longa (LT-CTH ou LT-HSC - *Long-term hematopoietic stem cell*) e de vida-curta (ST-CTH ou ST-HSC - *Short-term hematopoietic stem cell*), que assumem papéis distintos, mas igualmente importantes para a continuidade da hematopoiese (Zago et al., 2013). A manutenção do *pool* indiferenciado e imaturo é garantida pela LT-HSC, que sofre uma divisão celular assimétrica, evento esse que lhe confere uma capacidade de autorrenovação. Essa divisão origina duas células-filhas diferentes entre si, sendo uma delas idêntica à célula-mãe, ou seja, uma nova LT-HSC, e outra um pouco mais diferenciada: a ST-HSC. Esse tipo celular, que pode sofrer igual influência dos fatores de crescimento, é uma célula com maior poder de proliferação, e passa por uma série de divisões que culminam na formação de progenitores multipotentes, que

posteriormente dão origem aos progenitores comprometidos com cada linhagem (Doulatov et al., 2012).

Com esse processo, são originados dois tipos de progenitores: CLP ou PLC (*common lymphoid progenitor* / progenitor linfóide comum), que precede linfócitos e células plasmáticas, e CMP ou PMC (*common myeloid progenitor* / progenitor mieloide comum), que resultam na formação de eritrócitos, granulócitos e megacariócitos (Figura 1) (Shafat et al., 2017).

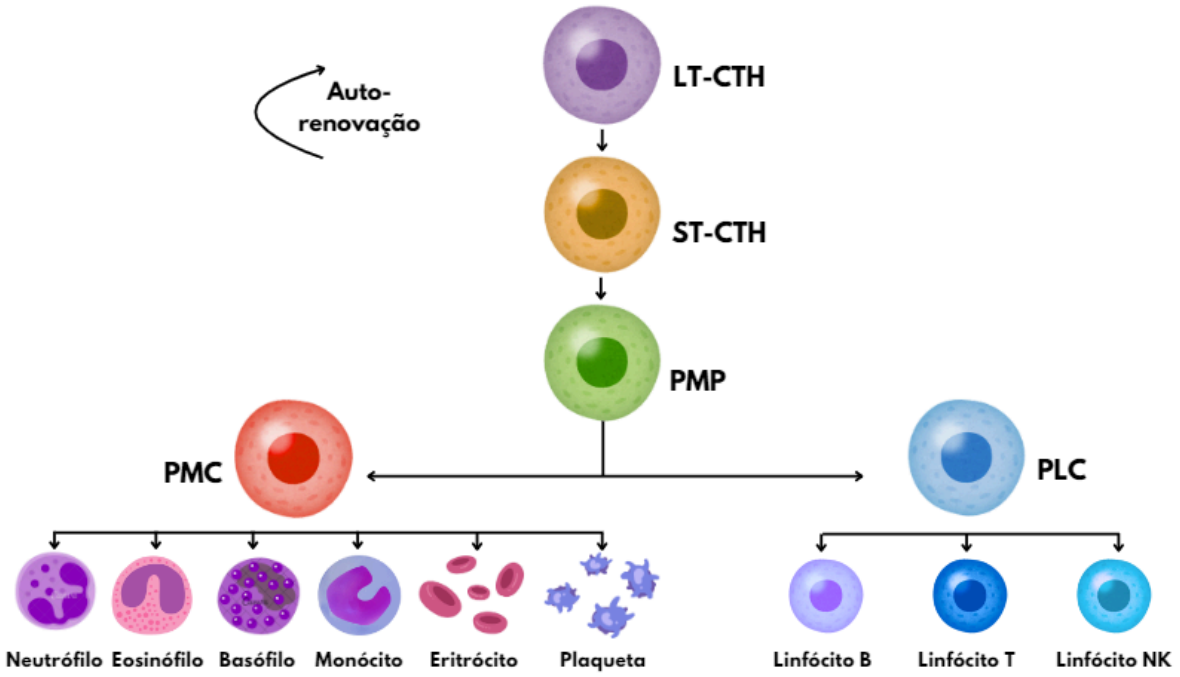

Figura 1: Modelo hierárquico da hematopoiese. As células tronco hematopoiéticas (CTHs) subdividem-se em vida-longa (LT-CTH) e vida-curta (ST-CTH). LT-CTH possui potencial de autorrenovação e gera a (ST-CTH) por divisões assimétricas. ST-CTH origina o progenitor multipotente (PMP), que por sua vez é capaz de se comprometer em progenitor mieloide comum (PMC), que promove a formação de toda a linhagem mieloide (Basófilo, Eosinófilo, Neutrófilo, Eritrócito, Plaqueta e Monócito), ou progenitor linfoide comum (PLC), que origina posteriormente os linfócitos T, B e NK. Adaptado (Bakhuraysah; Siatskas; Petratos, 2016).

1.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A leucemia mieloide aguda (LMA) consiste em um grupo de neoplasias hematológicas heterogêneas de caráter clonal, onde células tronco hematopoiéticas passam a se diferenciar pouco ou anormalmente, devido a um acúmulo de mutações somáticas, ocasionando a falha da capacidade maturativa e perda da resposta aos estímulos de morte celular (Dohner et al., 2015). Como consequência, essas células, denominadas blastos leucêmicos, começam a infiltrar a medula óssea, sangue periférico e outros tecidos, comprometendo o processo hematopoiético normal e tornando-o ineficaz, fato esse que ocasiona as chamadas citopenias (Jacomo et al., 2017).

Em decorrência a esse processo, sucedem-se os achados laboratoriais mais prevalentes apresentados pelos pacientes: anemia normocítica normocrômica, plaquetopenia e leucocitose (geralmente menor que 100.000 leucócitos) com neutropenia. Juntamente com a capacidade de infiltração dos blastos leucêmicos, essas condições contribuem com a manifestação dos principais sintomas relacionados com a doença, tais como fadiga, palidez, sangramentos, petéquias, febre, infecções recorrentes e as megalias, principalmente hepatoesplenomegalia (Zago et al., 2013).

A LMA subdivide-se em dois grandes grupos, sendo eles LMA *de novo* ou primária, e LMA secundária, sendo esta advinda de síndrome mielodisplásica, neoplasias mieloproliferativas, anemia aplásica e relacionada a tratamento (Khoury et al., 2022).

A heterogeneidade da doença pode ser atribuída a inúmeros fatores, sendo um deles a diversidade de precursores hematopoiéticos que podem ser acometidos, bem como a grande quantidade de mutações que podem colaborar com o fenótipo leucêmico (Hope; Dick, 2004) Além disso, estudos apontam que a diversidade fenotípica da doença ocorre em resposta a sua heterogeneidade genotípica (Desai; Zandvakili; Bohlander, 2022).

1.2.1 Epidemiologia

Apesar de acometer indivíduos de qualquer faixa etária, a idade média do diagnóstico se estabelece em torno de 66 anos, sendo 54% dos pacientes diagnosticados após os 65 anos e 33% após os 75 anos (Tebbi, 2021). Acerca dos dados epidemiológicos globais sobre a doença, estudos apontam uma tendência de crescimento na incidência e mortalidade da LMA entre os anos de 1990 e 2019, sendo o maior aumento observado na faixa etária de 85 a 89 anos (Chen et al., 2024). Apesar disso, o grupo que apresentou maior incidência de LMA em 2019 corresponde a faixa etária de 70 a 74 anos (Chen et al., 2024). Algumas das avaliações levam em consideração as leucemias de maneira geral como um só grupo. De acordo com o GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), serviço fornecido pela Organização Mundial de Saúde, a incidência global de leucemias no ano de 2022 foi de 5,3 a cada 100.000 habitantes, sendo 487.294 o número bruto de novos casos. A mortalidade das leucemias se encontra em 3,1 a cada 100000 habitantes, se apresentando superior em países subdesenvolvidos (Global Cancer Observatory, 2024).

Dentre os adultos diagnosticados com leucemias, a LMA representa ⅓ do total para a população estadunidense em 2024, no entanto corresponde a 1% do total de cânceres registrados (American Society of Cancer, 2024). Outros estudos apontam que, no ano de 2020, foram registrados 19.940 novos casos de LMA e 11.180 óbitos pela causa nos Estados Unidos, sendo considerada o tipo de leucemia com maior taxa de mortalidade (Chen et al., 2024). O cenário brasileiro segue o mesmo padrão de agrupamento, sendo possível avaliar a incidência de leucemias por dados provenientes do Instituto Nacional de Câncer - INCA. As estimativas para o ano de 2023 apontam que os estados com maior incidência para leucemias são: Amazonas, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro e Santa Catarina, com valores variando entre 5,14 e 8,39 novos casos a cada 100.000 habitantes. Já os estados com menor incidência variam entre 1,91 a 4,11 casos a cada 100.000 habitantes (Figura 2) (INCA, 2022). No Brasil, a taxa bruta de mortalidade no ano de 2022, utilizando como parâmetros as CIDs 92, 93 e 94 (Leucemias Mieloides, Leucemias Monocíticas e Outras Leucemias de Tipo Celular Específico, respectivamente), foi de 1,77 para cada 100.000 habitantes, maior valor de mortalidade dos últimos 10 anos (Tabela 1) (INCA, 2024).

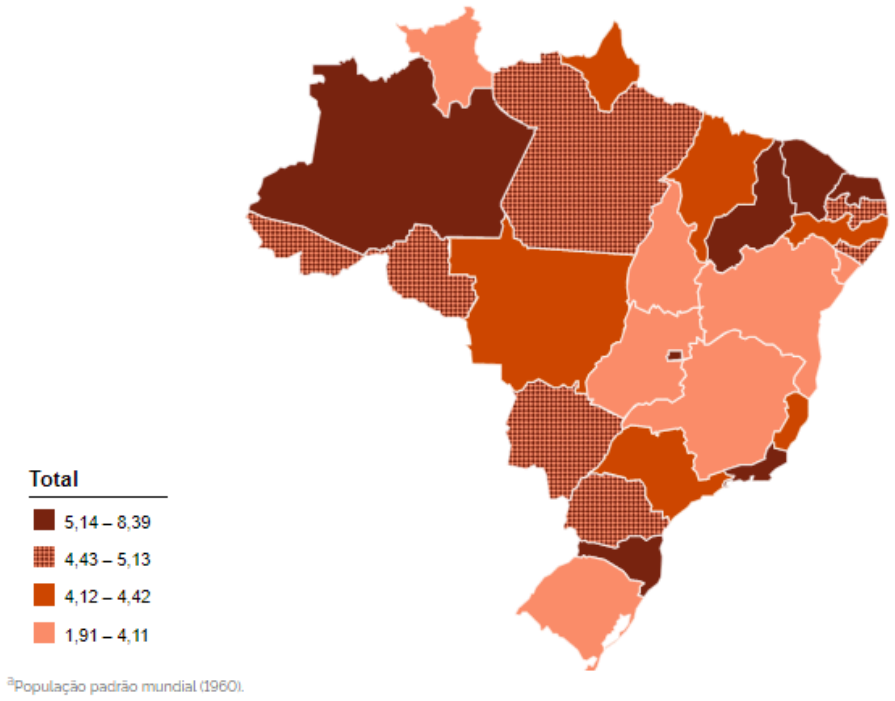

Figura 2: Distribuição espacial das taxas ajustadas de incidência de leucemias por 100 mil habitantes, estimadas para o ano de 2023 no Brasil, segundo Unidade da Federação. Os dados são estratificados em 4 categorias, correspondentes a suas respectivas cores no mapa. (INCA, 2022).

Tabela 1: Incidência de Leucemias Mieloides, Leucemia Monocítica e Outras Leucemias de células de tipo específico. Os valores de incidência são estabelecidos a cada 100.000 habitantes, com população padrão mundial datada de 2010. (INCA, 2024).

Ano	Valor Absoluto	Taxa Bruta	Taxa Ajustada Mundial	Taxa Ajustada Brasil
2012	2948	1,49	1,37	1,45
2013	3088	1,54	1,40	1,48
2014	3087	1,53	1,36	1,45
2015	3339	1,64	1,43	1,53
2016	3450	1,68	1,44	1,54
2017	3349	1,62	1,36	1,45
2018	3582	1,72	1,42	1,51
2019	3720	1,77	1,43	1,52
2020	3415	1,61	1,27	1,36
2021	3553	1,67	1,29	1,38
2022	3770	1,77	1,36	1,46

*LEUCEMIA MIELOIDE, LEUCEMIA MONOCITICA e OUTRA LEUCEMIAS DE CELULAS DE TIPO ESPECIFICO

1.2.2 Fisiopatologia

Como abordado anteriormente, um acúmulo de mutações é necessário para proporcionar a transformação leucêmica. Apesar do aparato funcional de reparo do DNA, as CTHs continuam suscetíveis a mutações em suas diversas etapas de desenvolvimento, desde progenitor pluripotente até o progenitor mieloide comum (Hope; Jin; Dick, 2004; Lindsley; Ebert, 2013). Uma vasta gama de alterações genéticas, sejam elas cromossômicas ou não, dão origem à célula tronco leucêmica (CTL), apresentando inclusive um impacto prognóstico significativo (Dohner et al., 2015).

As principais mutações cromossômicas que contribuem com a fisiopatologia da LMA são chamadas alterações genéticas recorrentes. Essas alterações consistem principalmente em translocações e inversões, que culminam na formação de genes de fusão a partir da combinação recíproca dos pontos de quebra, capazes de interferir em processos específicos, seja pela incapacidade de execução de suas funções fisiológicas ou por adotar um papel oncogênico. A exemplo disso, temos a inv(16) ou t(16;16), t(15;17) e a t(8;21), respectivamente responsáveis pela formação dos genes de fusão *CBFb-MYH11*, *PML-RARA* e *RUNX1-RUNX1T1* (também chamado de *AML1-ETO*) (Dohner et al., 2017).

Acerca do papel funcional de cada alteração, o gene *RUNX1* é responsável pela regulação da hematopoiese. No entanto, quando fundido ao gene ETO ou RUNX1T1, torna-se um regulador negativo do gene *CEBPA*, provocando perda na capacidade de diferenciação da linhagem mieloide. Ambos os genes *PML* e *RARA* possuem influência na hematopoiese, sendo reguladores de proliferação e diferenciação celular, respectivamente. A fusão desses genes resulta na perda de resposta a apoptose e bloqueio na diferenciação, e está relacionado a um subtipo de LMA, chamado Leucemia Promielocítica Aguda (LPA). O gene de fusão *CBFb-MYH11*, apesar de fazer parte do processo de leucemogênese, não apresenta um papel de iniciação da doença (Goldman et al., 2019). Entretanto, cerca de 50% dos pacientes possuem cariótipo normal, portanto apresentando mutações em outros genes que contribuem com a progressão e estabelecimento da LMA, a exemplo dos genes *FLT3, CEBPA* e *NPM1* (Döhner et al., 2008).

O modelo “two-hit”, desenvolvido em fases iniciais do estudo da LMA, estabelece que a transformação leucêmica ocorre após, pelo menos, dois tipos de

mutações concomitantes na CTH, que afetam mecanismos distintos. O primeiro tipo de mutação envolve o domínio das enzimas tirosina-quinases, responsáveis pela transdução de sinal de inúmeras vias de sinalização, inclusive vias relacionadas à proliferação celular. Como exemplo, destacam-se mutações em *FLT3* (mais frequentemente a mutação do tipo ITD) e c-Kit. Já o segundo tipo afeta os fatores e ativadores de transcrição, alterando o equilíbrio molecular fisiológico e diferenciação celular, apoptose e maturação, como é o caso das translocações que formam os genes de fusão *RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA* e *MLL-AF9* (Figura 3) (Chen et al., 2022).

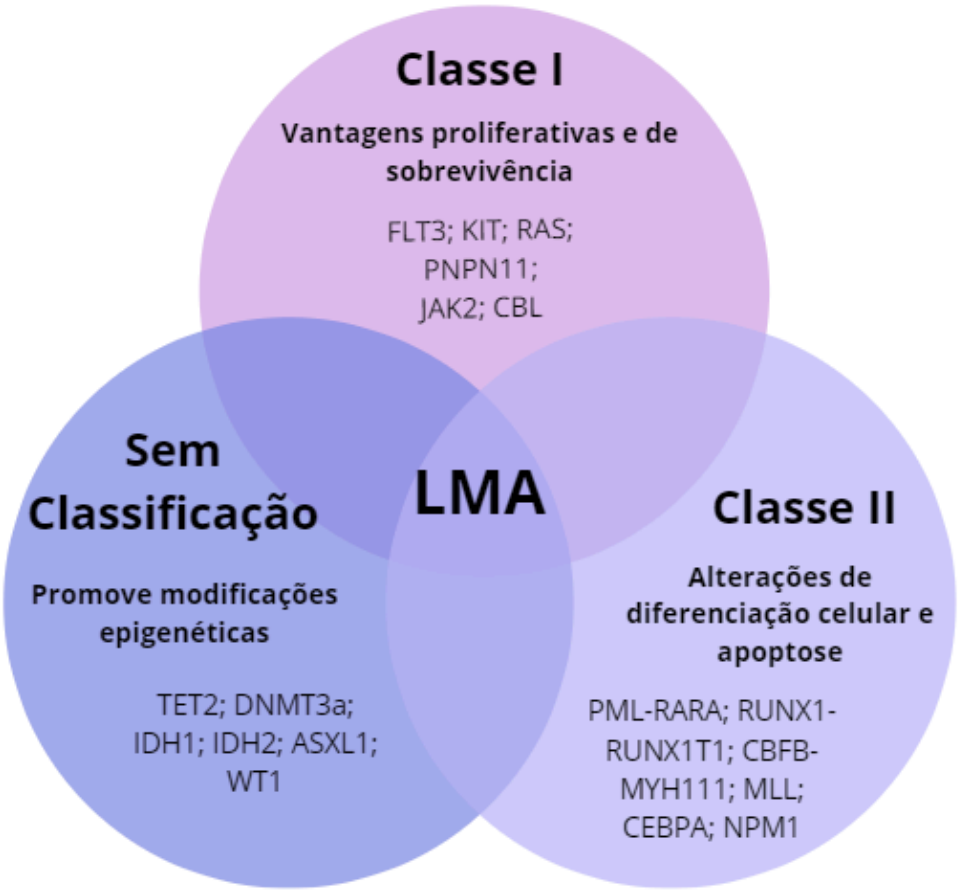

Figura 3: Diagrama de Venn descrevendo as principais mutações de Classe I (conjunto superior), Classe II (conjunto lateral da direita) e Epigenéticas (conjunto da lateral esquerda) relacionadas a LMA. Adaptado (Lagunas-Rangel et al., 2017)

Assim como na hematopoiese normal, o microambiente da medula óssea também exerce grande influência para a manutenção e desenvolvimento das CTLs, podendo inclusive diminuir a capacidade de ação de quimioterápicos (Shafat et al., 2017). Esse microambiente, composto por uma diversidade de tipos celulares, pode ser alterado em decorrência da transformação leucêmica, evento que pode induzir a proliferação e diferenciação incorretas dessas células (Borella et al., 2021). Alguns dos fatores que contribuem para essa resolução são o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS), HIF-1alfa, assim como participação na ativação de vias de sinalização essenciais para regulação da diferenciação e proliferação (Chen et al., 2022).

A regulação epigenética exerce um papel preponderante na transformação leucêmica (Issah et al., 2021). Este termo se trata de um conjunto de modificações pós transcricionais em elementos codificantes ou não codificantes, que culminam na alteração da expressão de um gene, sem que ocorra uma mudança no código genético (Dupont; Armant; Brenner, 2009). A recente caracterização desses genes colocou em xeque a hipótese two-hit previamente estabelecida, levando em conta que esse grupo não se encaixa em nenhuma das classes propostas, possuindo mecanismos de ação distintos na leucemogênese. Os componentes genéticos afetados por esse processo, sejam eles DNA, RNA e histonas, sofrem alterações químicas em sítios específicos, tais como metilação, acetilação, fosforilação, demetilação e isomerização, que podem colaborar com mudanças conformacionais e de estabilidade (Issah et al., 2021). Mutações em genes participantes desses processos, como *DNMT3, IDH1, IDH2, TET2, METTL3, METTL14, FTO*, entre outros, podem impactar no equilíbrio fisiologicamente estabelecido, e colaborar para a iniciação e manutenção de um estado pré-leucêmico (Figura 3) (Moran-Crusio et al., 2011; Shlush et al., 2014; Issah et al., 2021).

1.2.3 Diagnóstico e Classificação

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o critério diagnóstico de uma leucemia aguda é definido por um percentual de 20% ou mais de blastos leucêmicos na medula óssea ou no sangue periférico (Arber et al., 2016). A identificação de elementos morfológicos também pode contribuir com o direcionamento na hipótese da LMA, como é o caso do Bastonete de Auer, uma estrutura formada por grânulos anormais nos lisossomos (Zago et al., 2013). Para

complemento do diagnóstico laboratorial e diferenciação definitiva entre LMA e LLA, é utilizada a imunofenotipagem, sendo atualmente considerada o método diagnóstico padrão ouro. (Craig; Foon, 2008; Zago et al., 2013).

Em 2022, foi estabelecida uma nova normativa para o diagnóstico laboratorial, que levava em consideração as anomalias genéticas recorrentes, tidas como patognomônicas da doença. Essas alterações podem ser observadas por biologia molecular (através da análise qualitativa do gene de fusão, com a utilização de técnicas como PCR) ou por citogenética (que procura captar as alterações estruturais nos cromossomos, pela metodologia de hibridização in situ por fluorescência). A detecção de qualquer uma delas, exceto a t(9;22) ou BCR-ABL, diminui o limite percentual de blastos para fechamento do diagnóstico para uma contagem maior ou igual a 10% (Tabela 2) (Tallman et al., 2019; Dohner et al., 2022).

Tabela 2: Critérios de diagnóstico de acordo com o percentual de blastos no sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO). Na seção superior, estão descritas as mutações que permitem diagnóstico pela detecção de ao menos 10% de blastos. Na seção inferior, encontram-se as outras categorias que permanecem no padrão de 20% ou mais. Adaptado (Dohner et al., 2022).

LMA e neoplasias relacionadas
LMA com alterações genéticas recorrentes (≥10% de blastos na MO ou SP) • LPA com t(15;17)(q24.1; q21.2) / *PML::RARA* • LMA com t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1::RUNX1T1* • LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/*CBFB::MYH11* • LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3)/*MLLT3::KMT2A* • LMA com t(6;9)(p22.3;q34.1)/*DEK::NUP214* • LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/*GATA2*, MECOM(*EVI1*) • LMA com outras translocações raras • LMA com *NPM1* mutado • LMA com mutação *in-frame* bZIP em *CEBPA*
Categorias designadas de LMA (se ≥20% de blastos na MO ou SP) ou SMD/LMA (se 10-19% de blastos na MO ou SP) • LMA com *TP53* mutado • LMA com mutações relacionadas a mielodisplasia (ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, e/ou ZRSR2 • LMA com alterações genéticas relacionadas a mielodisplasia • LMA com t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR*::*ABL1* • LMA sem outra especificação

A LMA subdivide-se em dois grandes grupos, sendo eles LMA *de novo* ou primária, e LMA secundária, sendo esta advinda de síndrome mielodisplásica, neoplasias mieloproliferativas, anemia aplásica e relacionada a tratamento (Khoury et al., 2022). Devido a heterogeneidade clínica, morfológica e genética da doença, o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) estabeleceu uma classificação baseada nas características morfológicas e citoquímicas dos blastos leucêmicos. A classificação FAB, amplamente reconhecida até a atualidade, foi inicialmente proposta em 1976 e teve sua última atualização no início da década de 90. Essa estratificação consiste na subdivisão de 8 grupos, nomeados de M0 a M7, numa ordem crescente de amadurecimento celular. Subtipos como o M3, correspondente à LPA, recebem destaque por alinharem as condições morfológicas e genéticas de maneira a ser possível identificar esse subtipo apenas por características marcantes dos blastos, como formato do núcleo (forma de halteres) e presença de numerosos Bastonetes de Auer (Célula de Faggot) (Zago et al., 2013).

No entanto, por não levar em consideração as alterações genéticas propriamente ditas, esse tipo de classificação se tornou rapidamente ultrapassada. A OMS, por sua vez, desenvolveu suas próprias diretrizes incorporando grande parte dos critérios utilizados na classificação FAB, e adicionando novas estratégias para subdivisão de características advindas de componentes genéticos (Vardiman; Harris; Brunning, 2002).

Na sua 4ª atualização, após as versões de 2001, 2008 e 2016, a classificação de 2022 estabelece a inclusão de novas mutações específicas na categoria de LMA com anormalidades genéticas definitivas, que possuem impacto prognóstico e diretrizes terapêuticas próprias (Tabela 3). Esse grupo, além das alterações genéticas recorrentes previamente mencionadas, é dotado das seguintes condições: LMA com rearranjo *KMT2A*; LMA com fusão *DEK::NUP214* (t(6;9)); LMA com rearranjo MECOM; LMA com fusão *BCR::ABL1*; LMA com fusão *RBM1::MRTFA*; LMA com *NPM1* mutado; LMA com *CEBPA* mutado; LMA com rearranjo *NUP98*; LMA com outra alteração genética definitiva. Critérios como LMA com *RUNX1* mutado, por exemplo, foram removidos dessa categoria por significância clínica limitada. As outras categorias que receberam pequenas modificações em relação às versões anteriores da classificação foram: LMA relacionada a Mielodisplasia;

Neoplasia mieloide relacionada à terapias; LMA não especificada anteriormente (baseado em critérios morfológicos) (Park, 2024).

Tabela 3: Comparativo da Classificação OMS dos anos de 2016 (esquerda) e 2022 (direita). São avaliadas as mutações que compõem a categoria de anormalidades genéticas definitivas/recorrentes. Adaptado (Park et al., 2024)

OMS2016		**OMS2022**	
Classificação	**%Blasto**	**Classificação**	**%Blasto**
LMA com alterações genéticas recorrentes		**LMA com alterações genéticas definida**	
LPA com *PML::RARA*	·	LPA com fusão *PML::RARA*	·
t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1::RUNX1T1*	·	fusão *RUNX1::RUNX1T1*	·
inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/*CBFB::MYH11*	·	fusão *CBFB::MYH11*	·
t(9;11)(p21.3;q23.3)/*MLLT3::KMT2A*	·	fusão *DEK::NUP214*	·
t(6;9)(p22.3;q34.1)/*DEK::NUP214*	**≥20**	rearranjo *MECOM*	·
inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/*GATA2*, MECOM(EVI1)	**≥20**	fusão *BCR::ABL1*	**≥20**
t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1*	**≥20**	*fusão RBM15::MRTFA*	·
t(1;22)(p13.3;q13.1)/ *RBM15::MLK1*	**≥20**	*NPM1* mutado	·
NPM1 mutado	·	*CEBPA mutado*	**≥20**
mutação bialélica em *CEBPA*	·	rearranjo *NUP98*	·
(provisório) *RUNX1* mutado	**≥20**	LMA relacionada a mielodisplasia	**≥20**
		LMA com outra mutação genética definida	**≥20**

1.2.4 Estratificação de Risco e Tratamento

Ainda motivados pela heterogeneidade da doença e as diversas respostas ao tratamento apresentadas pelos pacientes, diversos grupos iniciaram seus esforços para estabelecer critérios de divisão que considerem os possíveis prognósticos, de acordo com as alterações genéticas descritas e considerando os padrões evolutivos da LMA (Boscaro et al., 2023). É importante salientar que, além desses critérios, condições individuais do paciente também interferem no desfecho da doença, como é o caso da idade. De acordo com estudos populacionais realizados com base de

dados dos EUA, a taxa de sobrevida em 5 anos de pacientes com 60 anos ou mais não excede os 15%, sendo ainda mais baixa para pacientes com 70 anos ou mais (Sasaki et al., 2021). Essa estatística é embasada pela significativa propensão a um risco citogenético elevado devido a carga mutacional de pacientes idosos, além da presença frequente de comorbidades (Walter et al., 2011).

Visando principalmente os pacientes idosos, foi criado um tipo de classificação denominada *status de performance* que avalia características gerais do paciente, e como elas interferem na mortalidade perante o tratamento. É estabelecido um *score* com base no estado geral e capacidade de realização de atividades cotidianas do paciente, que vai de 0 a 4, em ordem crescente de comprometimento (Paras et al., 2023).

Atualmente, a classificação mais completa e reconhecida internacionalmente pertence ao grupo European Leukemia Net (ELN), que desenvolveu um modelo de estratificação de risco, baseado no panorama genético da LMA. Com sua versão mais recente datando de 2022, essa estratificação é principalmente levada em consideração no momento da avaliação da terapia mais adequada para o paciente em questão de intensidade, uma vez que indica o potencial prognóstico da doença para cada categoria (Dohner et al., 2022).

Diferente de sua versão anterior (2017), que possuía 4 subgrupos (favorável, intermediário I, intermediário II e adverso) a categoria de risco é subdividida em 3 grupos. O grupo de risco favorável compreende a mutações em *NPM1* (sem mutação *FLT3*-ITD) e *CEBPA* (mutação na região bZIP), além das translocações (8;21) e (16;16)/inv(16). Para os pacientes que se enquadram nesse grupo, em linhas gerais, costumam-se adotar medidas de tratamento mais conservadoras, com uso de quimioterapia de indução e consolidação. O grupo de risco adverso é composto pela deleção dos cromossomos 5 e 7, mutações somáticas nos genes relacionados a mielodisplasias (predominantes em LMAs secundárias), mutação em *TP53* (clássico gene supressor tumoral), diversas translocações e inversões e o chamado cariótipo complexo. Possuem cariótipo complexo os pacientes que apresentam 3 ou mais anormalidades cromossômicas não relacionadas. Levando em consideração o pior prognóstico associado ao grupo, geralmente é considerada uma terapia mais intensa, prioritariamente baseada no Transplante de Medula Óssea (TMO) (Dohner et al., 2015).

O grupo de risco intermediário, considerado o de manejo mais discutível, abrange mutação simultânea em *NPM1* e *FLT3* (ITD), mutação apenas em *FLT3*, t(9;11) e qualquer outra anormalidade citogenética ou mutação não enquadrada nas outras categorias (Tabela 4). A conduta com os pacientes enquadrados nessa categoria pode sofrer variações a depender de fatores individuais. Para a parcela dos pacientes que não apresenta uma resposta satisfatória aos tratamentos clássicos, o TMO pode ser considerado (Dohner et al., 2022; Park et al., 2024; Short; Ravandi, 2016).

Tabela 4: Estratificação de Risco do grupo European Leukemia Net de 2022. Adaptado (Dohner et al., 2022).

Categoria de Risco	Anormalidade genética
Favorável	• t(8;21)(q22;q22.1)/ *RUNX1::RUNX1T1* • inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/ *CBFB::MYH11* • *NPM1* mutado, sem *FLT3*-ITD • Mutação *in-frame* bZIP em *CEBPA*
Intermediário	• *NPM1* mutado, com *FLT3*-ITD • *NPM1* selvagem com *FLT3*-ITD (sem condições genéticas de risco adverso) • t(9;11)(p21.3;q23.3)/*MLLT3::KMT2A* • Anormalidade molecular e/ou citogenética não classificada como favorável ou adversa
Adverso	• t(6;9)(p23.3;q34.1)/*DEK::NUP214* • t(v;11q23.3)/ rearranjo *KMT2A* • t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1* • t(8;16)(p11.2;p13.3)/*KAT6A::CREBBP* • inv(3)(q21.3q26.2) ou *t(3;3)(q21.3;q26.2)/ GATA2, MECOM(EVI1)* • t(3q26.2;v)/ rearranjo *MECOM(EVI1)* • −5 ou del(5q); −7; −17/*abn(17p)* • Cariótipo complexo, cariótipo monossomal • Mutação em *ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 e/ou ZRSR2* • *TP53a* mutado

O esquema terapêutico da LMA, de modo geral, consiste numa etapa de indução e numa de consolidação, a fim de garantir o máximo possível a erradicação dos blastos leucêmicos. Desde os anos 70, o tratamento de indução costuma obedecer o protocolo quimioterápico chamado “3+7”, que corresponde a 7 dias de citarabina (ara-C) e 3 dias de uma antraciclina, geralmente a daunorrubicina. Já a consolidação pode variar de acordo com o risco prognóstico do paciente, e

costumam variar entre altas doses de citarabina ou TMO (Dohner et al., 2015). No entanto, essa conduta não proporciona uma alta sobrevida global em 5 anos para todos os grupos de pacientes, correspondente a 45% para pacientes de 50 a 55 anos, e de 15% para pacientes com mais de 60 anos (Kantarjian et al., 2021).

Uma das exceções desse protocolo ocorre na presença da translocação 15;17, cujo tratamento padrão é pautado no uso de ATRA (Ácido transretinóico) e ATO (trióxido arsênico), por vezes usados em combinação (Tomita; Kiyoi; Naoe, 2013). Tendo em vista o percentual de recaídas e a baixa taxa de sobrevida global da LMA, novas terapias mais específicas vêm sendo desenvolvidas, levando em consideração a variabilidade mutacional de cada paciente, principalmente para cenários em que a mutação acarreta em um prognóstico desfavorável (Kantarjian et al., 2021).

1.3 Modificações pós-transcricionais em RNA mensageiro

Apesar das alterações genéticas recorrentes contribuírem com a leucemogênese para grande parte dos pacientes, 45% deles apresentam o chamado cariótipo normal (Dohner et al., 2015). Isso indica que outros genes interferentes no fenótipo leucêmico podem ser responsáveis pela transformação e manutenção da LMA. O estudo do panorama mutacional e de expressão da nova classe de genes relacionados à regulação epigenética proporciona uma ampla oportunidade para identificação de mecanismos atrelados ao seu funcionamento (Issah et al., 2021).

Pesquisas recentes indicam que variações nos seus padrões de expressão podem alterar tanto processos fisiológicos quanto processos patológicos na hematopoiese (Han; Chen; Su, 2022). Desde o início da década de 50 até os dias de hoje, foram identificadas e descritas mais de 100 tipos de modificações em RNA. No entanto, as alterações de mRNA e RNAs não-codificantes começaram a receber destaque apenas no início dos anos 2000 (Liu; Pan, 2015). Desse modo, a relevância e o comportamento de diversas modificações permanece desconhecido, inclusive no contexto da LMA (Rosselló-Tortella; Ferrer; Estreller, 2020). Dentre as modificações no mRNA que possuem maior destaque na literatura, as modificações identificadas como participantes em processos envolvidos na LMA são: m6a, m5c, m7g, ac4c e A-to-I.

1.3.1 Modificação N6-Metiladenosina - m6a

A m6a é uma das modificações pós-transcricionais mais presentes em mamíferos, principalmente no contexto de mRNA. Identificada pela inserção de um radical metil no 6º carbono do nucleosídeo de adenosina, essa metilação está relacionada a processos como regulação do splicing, estabilidade/degradação e equilíbrio da tradução, assim como diversos outros tipos de modificações (Zhang et al., 2020; Pan et al., 2023). Além disso, recebe destaque por ter envolvimento em vias de diferenciação e metabolismo celular (Zhao; Roundtree; He, 2017). Essa alteração pode estar presente em todos os elementos do mRNA, desde a região codificante, representando 35% do total de resíduos, até em ambas as extremidades, com destaque para os sítios próximos aos códons de parada (Mao et al., 2019).

A detecção da metilação pode ser realizada por diversos métodos, que possuem características distintas no modo de identificação. Duas maneiras muito similares amplamente utilizadas para mapeamento da m6a são o ensaio de MeRip-seq e m6a-seq, baseados na imunoprecipitação com uso de anticorpos específicos no RNA Poly(A) isolado (mRNA) e fragmentado, e posteriormente sequenciado (Dominissini et al., 2012). Ambas as metodologias foram capazes de identificar mais de 7000 genes que continham m6a, variando entre 10000 e 12000 picos apresentados apenas no mRNA. A partir desses dados, foi avaliado que as adenosinas sujeitas à metilação encontram-se predominantemente em motivos específicos, que corresponde a diversas combinações de sequências de bases evidenciadas através do código DRACH (Fu et al., 2014).

Logo, DRACH lê-se: D=guanina, uracila e adenina; R= qualquer base púrica; A=adenina; C=citosina; H=adenina, uracila e citosina (Liu et al., 2014; Dominissini et al., 2012). Essas regiões estão enriquecidas principalmente na extremidade 3’ UTR, próximas a códons de parada (Wang et al., 2022; Fu et al., 2014). No entanto, a identificação dos sítios metilados por esses métodos se dá apenas em forma de picos do material precipitado, o que diminui consideravelmente a sensibilidade e precisão do método (Roberts; Porman; Johnson, 2021).

Nesse sentido, foi aplicado um novo método, chamado CLIP (imunoprecipitação com ligações cruzadas), que possui variações tais como meCLIP, miCLIP e m6a-CLIP. Essas metodologias basicamente adicionam uma nova etapa

em relação ao clássico MeRIP-seq, utilizando radiação UV após ligação entre anticorpo e adenosina metilada para provocar liberação de radicais livres e gerar ligações covalentes. Em seguida, é utilizada proteinase K para remoção dos anticorpos, mas mantendo intactos os aminoácidos que formam ligações cruzadas (Linder et al., 2015).

A formação dessas ligações cruzadas nos sítios de m6a é essencial para o sucesso do método, visto que provocam uma mudança de C para T nas citocinas adjacentes à metilação durante a etapa de RT-PCR, permitindo uma resolução de nucleotídeo único (single-nucleotide) (Ke et al., 2015; Linder et al., 2015; Roberts; Porman; Johnson, 2021). Além disso, em dois dos três métodos são adicionados adaptadores de RNA que se ligam em regiões chave para auxiliar no sequenciamento. O método de m6a-CLIP adiciona dois adaptadores no mesmo momento, enquanto meCLIP adiciona um para as ligações cruzadas e outro somente após síntese de cDNA, específico para ssDNA (DNA fita única) (Roberts; Porman; Johnson, 2021; Hafner et al., 2010; Ke et al., 2015). Já o método de miCLIP substitui o uso de adaptadores por uma etapa de circularização e re-linearização do cDNA, diminuindo consideravelmente a complexidade do mapeamento (Roberts; Porman e Johnson, 2021; Linder et al., 2015; Grozhik et al., 2017).

Uma maquinaria complexa é necessária para execução e regulação dessa modificação, composta essencialmente por grupos (Figura 4). O primeiro conjunto corresponde às metiltransferases, também conhecidas como “writers”, responsáveis por inserir o grupamento metil. A esta classe pertencem principalmente proteínas da família METTL (metiltransferase-like), com destaque para as enzimas METTL3 e METTL14 (Liu et al., 2014). Essas proteínas compartilham de cerca de 43% de homologia, e funcionam juntos através da formação de heterodímeros, onde METTL14 se liga ao RNA, e METTL3 é responsável por catalisar a metilação propriamente dita (Wang et al., 2022; Hong et al., 2022).

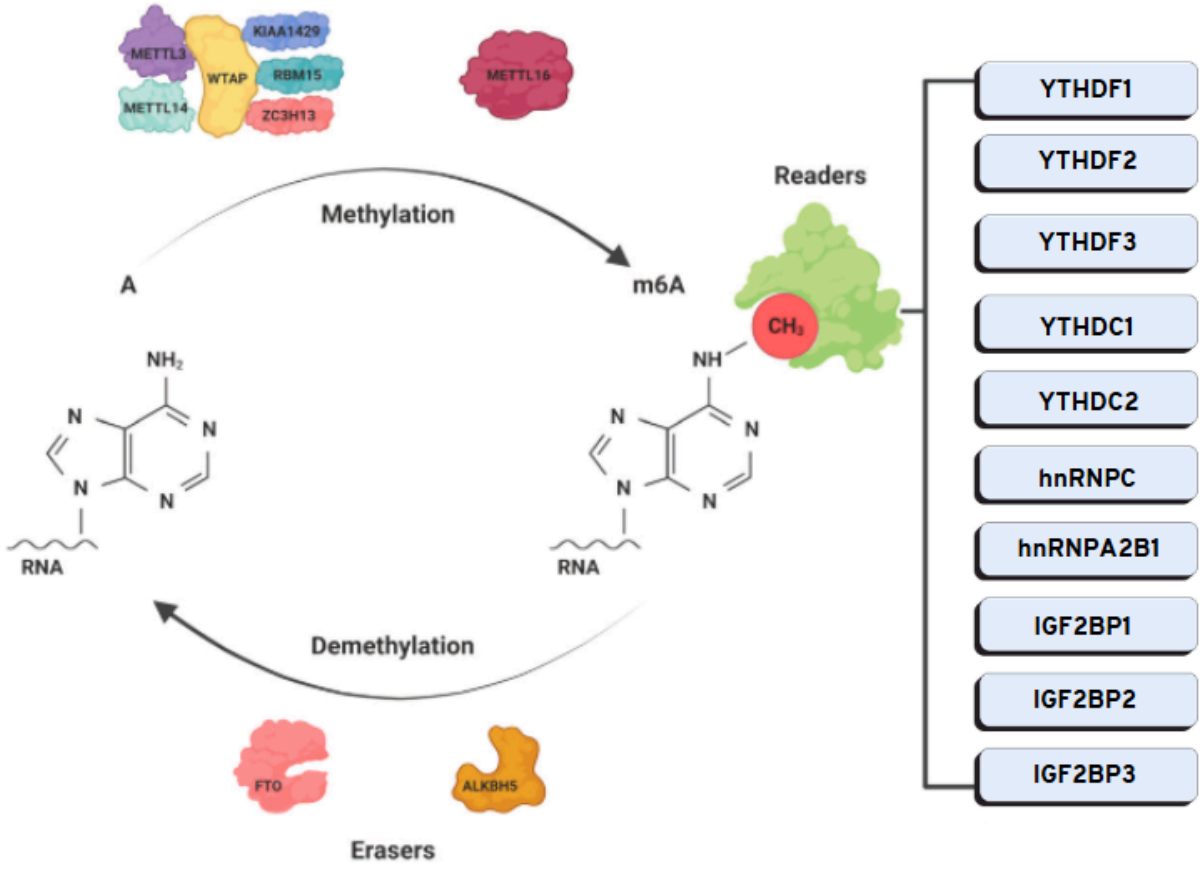

Figura 4: Maquinaria funcional da m6a. O equilíbrio da metilação é regido por metilases ou Writers (METTL3, METTL14, WTAP, KIAA1429 ou VIRMA, RBM15, ZC3H13), demetilases ou Erasers (FTO e ALKBH5) e proteínas de ligação ou Readers (listados à direita da figura). Adaptado (Liu et al., 2022).

Variações na expressão dessas proteínas podem causar graves desequilíbrios, e estudos apontam para a relação do complexo com uma diversidade de cânceres, tais como LMA, câncer de fígado, câncer de pulmão, glioblastoma, câncer de mama, entre outros (Zeng et al., 2020; Guan et al., 2022). Além do complexo principal, outras proteínas participam ativamente como moduladores da metilação em mRNA, tais como: WTAP, METTL16, VIRMA, RBM15/15b, ZC3H13 e CBLL1 (Wang et al., 2022). A maioria delas, com exceção da METTL16, exerce seu papel em associação com a WTAP, que por sua vez está diretamente ligada ao complexo METTL3/14, e é responsável pelo recrutamento do mRNA (Ping et al.,

2014).

Funções como metilação de regiões específicas (VIRMA), localização nuclear (RBM15/15b e ZC3H13) e estabilização do complexo (CBLL1) são atribuídas a essas proteínas (Liu et al., 2018; Knuckles et al., 2018; Bawankar et al., 2021). A contribuição da enzima METTL16 é predominantemente relacionada com os snRNAs (Aoyama; Yamashita; Tomita, 2020), metilação de MAT2A (Hong et al., 2022) e homeostase do SAM (s-adenosilmetionina), cofator necessário para a m6a (Mermoud, 2022). Estudos recentes apontam sua provável colaboração como metiltransferase de mRNA, bem como sua relação com processos de tumorigênese (Su et al., 2022).

Uma vez inserida a m6a, proteínas de ligação comumente denominadas “readers” são responsáveis pelo reconhecimento da metilação e acionamento de vias específicas, a depender do sítio e do mRNA alvo. Em suma, correspondem aos operadores funcionais propriamente ditos. As proteínas de ligação que compõem esse grupo se subdividem em classes (Liu et al., 2023). A primeira classe é composta pelas proteínas da família YTH (YTHDC1, YTHDC2, YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3), que, através de domínios de mesmo nome, formam ligações diretas com a m6a (Xu et al., 2021). Apesar de apresentarem o mesmo domínio de ligação, a função de cada uma delas varia de acordo com suas estruturas individuais. Algumas das funções cumpridas por essas proteínas são: promoção da tradução (YTHDF1, YTHDF3 e YTHDC2), equilíbrio da estabilidade (YTHDF2, YTHDF3 e YTHDC2), splicing (YTHDC1) e helicase (YTHDC2) (Zhu et al., 2014).

De maneira geral, o controle de todas essas etapas de processamento do transcrito se dá através do recrutamento de componentes específicos para cada um dos processos. Por exemplo, o controle da tradução é regido pelo recrutamento de ribossomos e ligação com fatores de iniciação como o ELF3C após sua ligação com o mRNA metilado (Wang et al., 2015). De maneira similar, o equilíbrio entre estabilidade e degradação se dá pelo recrutamento de complexos de degradação, como o CCR4-NOT (Du et al., 2016). O splicing e exportação nuclear são regulados pela ligação de fatores tais como o SRSF3 (Xiao et al., 2016).

A segunda classe de “readers” é constituída por proteínas heterogêneas de ácidos ribonucléicos (hnRNPs), com destaque para duas: hnRNPC e hnRNPA2B1. O mecanismo de atuação dessa classe se baseia na perturbação molecular provocada pela inserção da m6a, acarretando em mudanças estruturais no transcrito e suas

proximidades (Liu et al., 2015). A partir disso, as hnRNPs se ligam no sítio da m6a e promovem splicing alternativo e processamento do mRNA (Shi et al., 2019). A terceira e última classe conta com proteínas da família IGF2BP, com proeminência dos membros: IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3. Essas proteínas se ligam ao mRNA metilado através de 6 sítios, sendo 4 domínios de homologia K (KH) e 2 motivos de reconhecimento do RNA (RRM) (Zhao et al., 2020). Após a ligação, contribuem para a estabilidade e tradução do transcrito pelo recrutamento de ELAVL-1 (Huang et al., 2018).

Por fim, o grupo dos “erasers” de m6a, que promovem a reversibilidade e regulação do processo, é composto principalmente por duas demetilases, ambas participantes da família de dioxigenases ALKB: FTO e ALKBH5. A remoção do radical metil por parte dessas enzimas ocorre por mecanismos distintos. A demetilase FTO remove através da oxidação do m6a, e posterior hidrólise de intermediários formados no processo (Liu et al., 2023). Enquanto isso, a ALKBH5 promove a remoção de maneira direta através do reconhecimento da metilação (Fu et al., 2014).

Estudos apontam para o potencial oncogênico da demetilação mediada por FTO em alvos como ASB2 e RARA, contribuindo para progressão da LMA (Li et al., 2017), bem como o de ALKBH5 em relação a TACC3 no mesmo contexto (Shen et al., 2020). No entanto, ambas são consideradas como supressores tumorais em outros tipos de câncer, como câncer de pâncreas e carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2022). Isso reforça que a dinâmica da m6a varia de acordo com o seu alvo, e seu desequilíbrio pode ocasionar uma gama de doenças, tanto por sua intensificação quanto por sua redução.

1.3.2 Modificação N5-Metilcitidina - m5c

Primeiramente descrita na década de 50, a modificação m5c é caracterizada pela adição de um grupamento metil no carbono 5 da base nitrogenada citosina. Recebendo destaque para o domínio dos organismos eucariontes, esta inserção pode ocorrer tanto em sítios codificantes quanto em sítios não codificantes, principalmente nas extremidades 3’UTR e 5’UTR do mRNA. Mostrou estar relacionada à estabilidade do transcrito, estrutura do mRNA e ao ritmo de tradução, de maneira similar a outros tipos de RNA, tais como rRNA e tRNA (Huang et al., 2019). A avaliação dessa metilação e sua frequência nos diferentes organismos se

mostrou um desafio, onde falsos positivos eram facilmente incluídos na contagem, e estudos encontraram números discrepantes de sítios com presença da modificação (Huang et al., 2019).

Com o surgimento da técnica de Bisulfite Sequencing (BS-Seq), específico para sequenciamento de citosinas metiladas em DNA e RNA, foram detectados cerca de 3212 sítios em humanos (Huang et al., 2019). Essa técnica consiste na capacidade da citosina metilada permanecer inalterada após a adição de bissulfito de sódio, enquanto as bases não-metiladas são convertidas em uracil, resultado do processo de desaminação provocado pelo reagente (Hussain et al., 2013). Em seguida, um Sequenciamento de Nova Geração (NGS) é utilizado para avaliar quais bases permanecem e ,através da comparação com a amostra não tratada, identificar em que sítios haviam citosinas metiladas (Song et al., 2022).

A maquinaria responsável pela inserção funciona de maneira similar a outras metilações, como por exemplo a m6a. O processo de equilíbrio da modificação em mRNA se mantém pela ação de 3 categorias de proteínas, sendo elas: metiltransferases, demetilases e proteínas de ligação, comumente chamadas de “writers”, “erasers” e "readers”, respectivamente (Figura 5) (Song et al., 2022). Entre as metiltransferases, são encontradas proteínas da família NSUN (NOL1/NOP2/Sun), compostas por um grupo de 7 proteínas: NSUN-1 a NSUN-7, além de proteínas do domínio DNMT (homólogo a DNA metiltransferase), mais especificamente DNMT1, DNMT2, DNMT3A e DNMT3B. No entanto, há divergências entre autores acerca das principais proteínas envolvidas no contexto da modificação em mRNA. As metiltransferases que recebem mais destaque no contexto de metilação em mRNA são NSUN2 e DNMT2 (Chellamuthu; Gray, 2020), além de NSUN-6 (Liu et.al., 2022).

A principal proteína de ligação responsável pela leitura de m5c em mRNA é a ALYREF (Aly/REF export factor ou THOC4 (Yang et al., 2017). Fisiologicamente, assume o papel de proteína chaperona, atuando na região bZIP do DNA. Além disso, funciona como proteína exportina para mRNAs, se ligando majoritariamente nas extremidades do transcrito e participando do transporte núcleo-citoplasma, promovendo a tradução do mRNA ligado (Shi et al., 2017). No entanto, esse processo parece ser regulado pela expressão de NSUN2, sugerindo que essa atividade é dependente da metilação m5c (Yang et al., 2017). Estudos recentes apontam, ainda, para a participação de YBX1 como mais uma proteína de ligação da

m5c, que teve seu papel descrito no contexto do câncer de bexiga (através da metilação do oncogene *HBGF*) e câncer cervical (estabilizando o gene *KRT13*) (Xu; Wang; Kuang, 2024).

A demetilase responsável por reverter a m5c tanto em DNA quanto em todos os tipos de RNA, é a Tet2 (Tet Metilcitosina dioxigenase 2), notoriamente envolvida na mielopoese (Shen et al., 2018). Seu papel de regulação está na capacidade de catalisar a oxidação do transcrito, transformando a base 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina, e dessa maneira reduzindo sua estabilidade e diminuindo seu potencial de tradução (Shen et al., 2018).

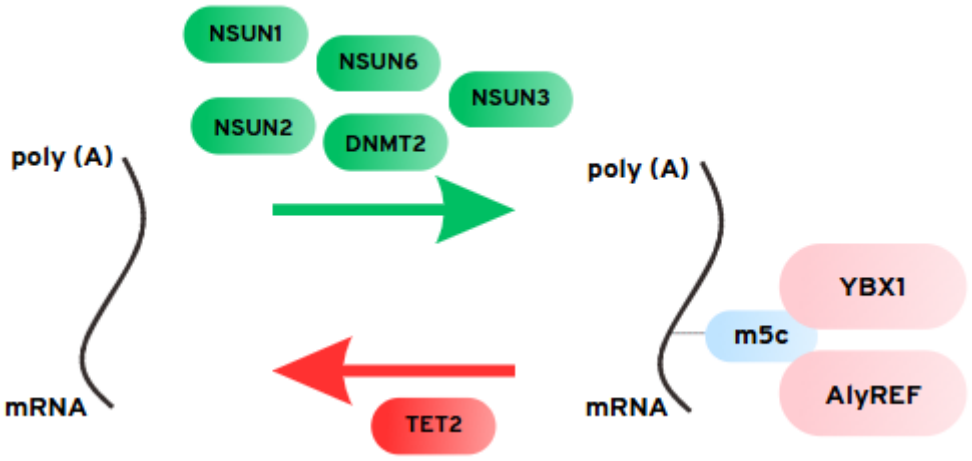

Figura 5: Dinâmica da modificação m5c. O mRNA, representado nominalmente e por sua cauda Poly(A), sofre influência majoritariamente das metilases (writers) NSUN1, NSUN6, NSUN3, NSUN2 e DNMT2, e demetilases (erasers) da família TET, mais especificamente a TET2. As proteínas de ligação (readers) YBX1 e AlyREF estão relacionadas a estabilidade e exportação nuclear, respectivamente. Adaptado (Song et al., 2022).

1.3.3 Modificação N7-Metilguanosina - m7g

A modificação m7g, que consiste na adição um radical metil no carbono de posição 7 da base nitrogenada guanosina, é amplamente descrita nos diversos tipos de RNA, principalmente tRNA, rRNA e mRNA (Zhang et al., 2023). Estudos realizados em mamíferos detectaram cerca de 44.058 alvos dessa metilação (Song et al., 2020). Em mRNA, se mostra relacionada com a estabilização do transcrito,

poliadenilação, splicing e exportação nuclear, que por sua vez favorece o processo de tradução, tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, como por exemplo em doenças do sistema nervoso (Xia et al., 2023) (Malbec et al., 2019). Essa metilação costuma ser evidenciada majoritariamente na extremidade 5’ UTR e Cap 5’ , e internamente na região rica em AG, em que cada um desses sítios apresenta um conjunto de proteínas reguladoras diferentes (Luo et al., 2022).

A metilação em 5’UTR e na região rica em AG é realizada pela metiltransferase METTL1 e seu cofator WDR4 em regiões que possuem similaridade com sequencias de tRNA (Zhang et al., 2019). Essas proteínas também fazem parte da m7g nos outros tipos de RNA. Já na extremidade Cap 5’, o processo é mediado pelo complexo RNMT/RAM (Figura 6), e a modificação é reconhecida ainda no núcleo pelas proteínas CBP80 e CBP20, que fazem parte do Complexo de Ligação ao Cap (CBP), e contribuem principalmente no processo de maturação, splicing, exportação e tradução (Malbec et al., 2019). Além disso, o complexo promove a transcrição dos alvos pelo recrutamento de RNA polimerase II de maneira independente do 5’ Cap (Varshney et al., 2018).

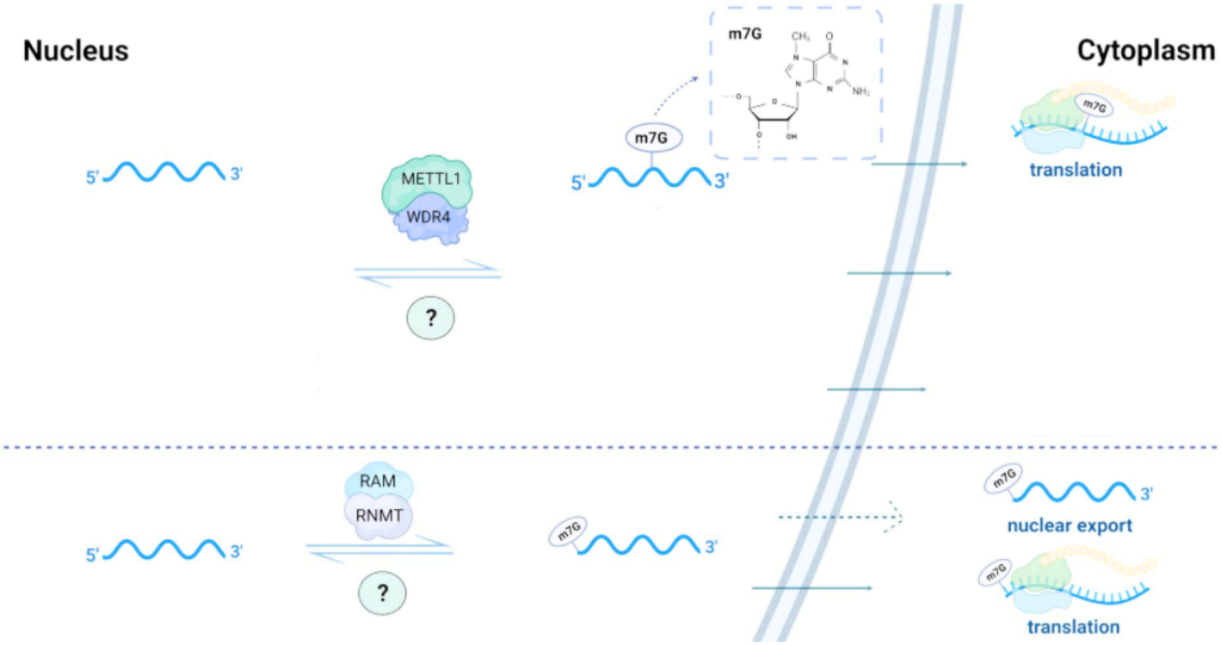

Figura 6: Modelo esquemático da maquinaria funcional da m7g. Regulados pelos complexos de instalação da metilação na estrutura Cap 5’ (inferior) e em regiões codificantes (superior), compostos respectivamente pelas enzimas RAM/RNMT e METTL1/WDR4. Adaptado (Luo et al., 2022).

A indução da tradução ocorre pelo recrutamento de eIF4E e Npl4, respectivamente um fator de iniciação e uma exportina, por parte do CBP (Furuichi, 2015). Dessa forma o eIF4E se liga ao 5’ Cap e promove os processos de exportação nuclear (Osborne et al., 2022). A respeito das proteínas de ligação, estudos recentes apontam a participação de membros da família QKI nesse processo, com destaque para a QKI7, que se liga ao mRNA metilado para mediação de estabilidade e tradução, principalmente em condições de estresse metabólico (Zhao et al., 2024). O método mais eficiente para detectar e quantificar a m7g é o m7g-seq, método baseado na reatividade química da metilação e posterior identificação de cada base por meio de transcrição reversa, uma vez que a m7g promove uma parada no processo, similar ao sequenciamento clássico (Zhang et al., 2019).

Essa análise permite uma avaliação apenas de modificações internas, excluindo a porção Cap 5’ por procedimentos pré-sequenciamento. Outros métodos amplamente utilizados são o m7g MeRIP-seq e o m7g miCLIP-seq, que seguem abordagens similares com uso de anticorpos anti m7g, mas se diferem pelo uso de luz UV por parte da segunda técnica. Esta induz a ligação destes anticorpos com o mRNA e torna-o mais sensível que o MeRIP-seq, que por sua vez consegue detectar a metilação em fragmentos de pelo menos 80 pb (Malbec et al., 2019) (Zhang et al., 2019).

1.3.4 Modificação N4-Acetilcitidina - ac4c

Diferente das modificações descritas nos tópicos anteriores, a ac4c ou N4-acetilcitidina se qualifica como uma acetilação da base nitrogenada citosina, e foi inicialmente descrita em tRNA e rRNA na década de 70 (Stern e Schulman, 1978) (Thomas et al., 1978). Posteriormente, estudos realizados constataram a presença dessa acetilação em mRNA, e que ela contribuia majoritariamente com a intensificação da tradução e estabilidade, principalmente em regiões codificantes do transcrito (Arango et al., 2018). A inserção do radical acetil é possibilitada pelo consumo de uma molécula de acetil CoA e ATP (Arango et al., 2022). A principal forma de detecção da ac4c é pautada na metodologia de imunoprecipitação,

denominada acRIP-seq. Na avaliação do conteúdo de ac4c em mRNA utilizando essa metodologia, foram encontradas acetilações em mais de 4000 sítios (Arango et al., 2018).

No entanto, não foram realizados estudos posteriores a esse que confirmem os dados encontrados. Novos estudos utilizando abordagens computacionais de análise de dados e inteligência artificial elaboraram um preditor de ac4c, denominado PACES, que foi capaz de avaliar os locais mais prováveis de ocorrência da modificação na base de dados utilizada (Zhao et al., 2019). Thomas et al, em 2018, propôs um outro método para detecção, relacionado às características moleculares da ac4c. O mRNA acetilado é suscetível a mudanças de pareamento quando tratado com NaBH4, em reação a redução quimicamente provocada. Tal mudança, que ocorre durante o processo de transcrição reversa, pode ser posteriormente detectada com o sequenciamento de Sanger. A proteína que catalisa a acetilação, nos três RNAs em que ela ocorre, chama-se NAT10 (Figura 7) (Arango et al., 2018).

Ela faz parte da família NAT relacionada a GCN-5, família essa composta por acetiltransferases de histonas (Jin et al., 2020). Até o momento, não foram identificados cofatores ou proteínas necessárias para a atividade da NAT10 em mRNA (Arango et al., 2018), diferente do processo em tRNA e rRNA (Jin et al., 2020), a sua contraparte (desacetilase), necessária para regulação e equilíbrio, ainda não foi descoberta. Apesar da modificação estar presente em condições fisiológicas, estudos recentes associam a ac4c com diversos tipos de câncer, metabolismo de ácidos graxos (Zhang et al., 2024), piroptose (Zhang et al., 2022), e participação no remodelamento de microambiente tumoral (Liu et al., 2023).

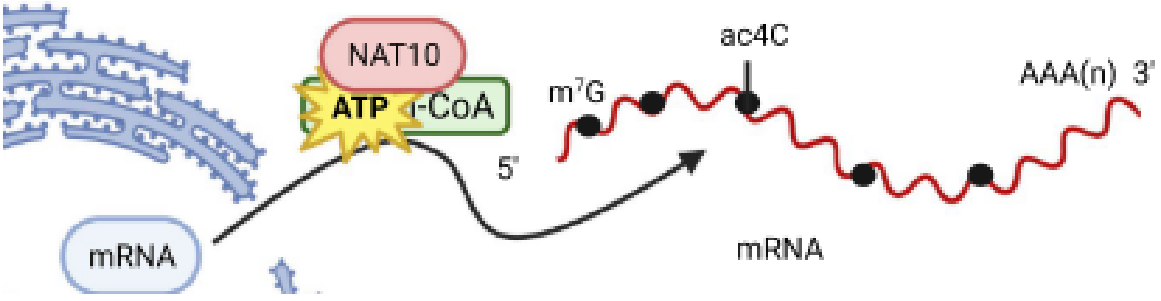

Figura 7: Mecanismo de ação da NAT10. Essa enzima é responsável por executar a acetilação de citosina ac4c, através de consumo de ATP e acetil-CoA. Adaptado (Zhang et al., 2024).

1.3.5 Modificação Adenosina-Inosina - A-to-I

A modificação adenosina-para-inosina, ou A-to-I não obedece o padrão de funcionamento observado nas alterações previamente descritas. Nessa alteração, ocorre a troca de um radical metil por um oxigênio através de hidrólise, preferencialmente na posição 6, conferindo um potencial diferente de pareamento de bases (Slotkin; Nishikura, 2013). Esse processo faz com que a inosina recém formada assuma um comportamento semelhante a guanosina, pareando, assim, com a citidina, e potencialmente contribuindo para a formação de novas proteínas em decorrência da mudança do transcrito em relação ao código genético, processo denominado edição por recodificação (Athanasiadis et al., 2004).

O método de identificação dessa alteração consiste na identificação da incorporação de guanosina no lugar da adenina (A para G) no processo de RT-PCR. Logo, o cDNA obtido será diferente do genoma original, e a alteração pode ser identificada através de comparação realizada por banco de dados. (Oakes; Vadlamani; Hundley, 2017). Estudos realizados utilizando essa metodologia apontam para mais de 1 milhão de sítios impactados pela A-to-I em RNA total (Bazak et al., 2014).

A A-to-I ocorre majoritariamente em RNAs não codificantes (Eisenberg e Levanon, 2018), como é o caso dos miRNAs, e em trechos não codificantes do mRNA. Ambos os casos são responsáveis por impactar na estabilidade e splicing do transcrito (Nishikura, 2016). O mecanismo da modificação requer a presença de RNAs de fita dupla (dsRNA), uma vez que as demetilases que a executam possuem regiões de ligação específicas a esse tipo de RNA (Nishikura, 2016). Além disso, pesquisas apontam uma relação entre a modificação e sequências repetitivas não codificantes denominadas *Alu*. As sequências *Alu* são dotadas de aproximadamente 280pb, e estão contidas majoritariamente na extremidade 3'UTR do mRNA de mamíferos. Essas repetições correspondem a cerca de 10% de todo o conteúdo do genoma humano e já foram descritas como potenciais fontes de variações em proteínas (Athanasiadis et al., 2004) (Bazak et al., 2014) (Gussakovsky; McKenna, 2021).

A disposição dessas sequências pode se dar de maneira normal ou inversa, o que faz com que sejam capazes de parear com estruturas complementares nas

proximidades (intermolecular) ou na própria fita em que ela está contida (intramolecular), em ambos os casos formando uma estrutura de fita dupla no pré-mRNA e tornando o transcrito suscetível à modificação (Kleinberger e Eisenberg, 2010). Acerca do seu papel na modificação, foi identificado que nem todas as adenosinas de uma Alu sofrerão alterações, mas há ao menos 1% de inosina na maioria das Alus existentes nos transcritos (Bazak et al., 2014). Além de servirem como alvo para a A-to-I, as Alus estão associadas à regulação do splicing (Payer et al., 2019).

A função de catalisar essa modificação é atribuída a três demetilases, participantes da família ADAR (Demetilase de adenosina específica ao RNA): ADAR1, ADAR2 e ADAR3 (Figura 8). No entanto, apenas a ADAR1 foi descrita como participante do processo envolvendo mRNA, enquanto as outras duas são majoritariamente expressas no cérebro e Sistema Nervoso Central (SNC), e atuam em genes relacionados a receptores de serotonina e glutamato, por exemplo. (Yang et al., 2021; Slotkin; Nishikura, 2013).

A ADAR1 possui três regiões de ligação ao dsRNA, e um domínio de ligação ao DNA denominado Zβ. Essa demetilase pode apresentar uma variação na sua estrutura, gerando duas isoformas pelo uso de promotores distintos: p110 e p150, representando as formas truncada e completa, respectivamente. A diferença entre elas está no domínio Zα, que se apresenta ausente no p110, e na capacidade de estímulo via Interferon por parte do p150. Essa região é ponto de ancoragem da exportina XPO1, que medeia a passagem da enzima do núcleo para o citoplasma. Como esse domínio está ausente na p110, o processo de exportação é mediado pela XPO5, com auxílio de dsRNA (Patterson et al., 1995; Nishikura, 2016).

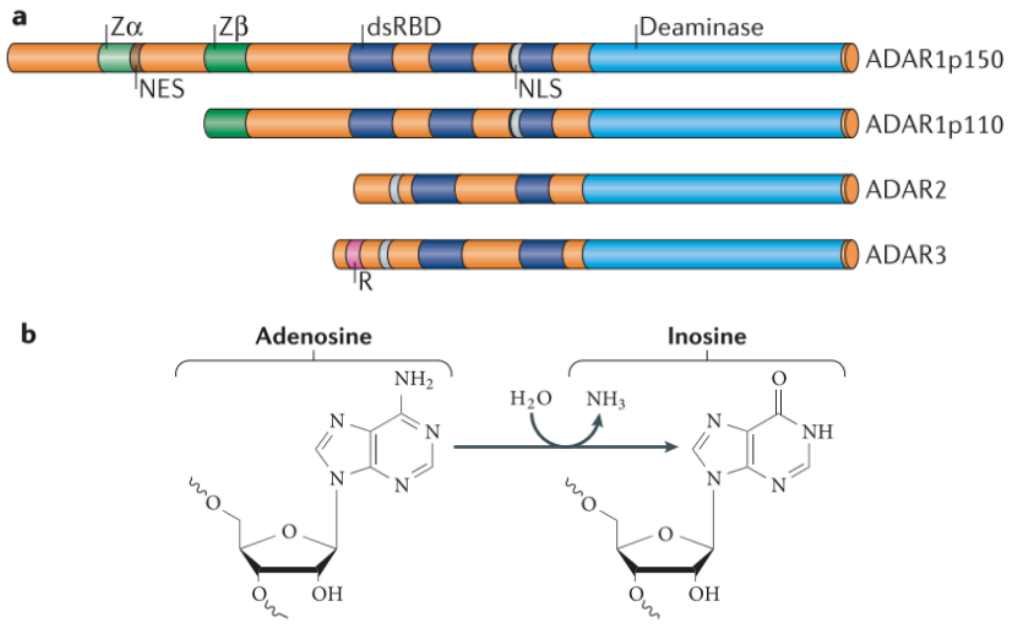

Figura 8: Modificação Adenosina-Inosina. (a) Domínios estruturais das demetilases da família ADAR e suas isoformas. (b) Estrutura do nucleosídeo Adenosina, que sofre hidrólise catalisada por demetilases, tornando-se Inosina. Adaptado (Nishikura, 2016).

Ambas as isoformas apresentam três domínios de ligação ao dsRNA, em que o terceiro é responsável pela homodimerização que ativa o funcionamento da proteína em alguns tipos de mRNA (Nishikura, 2016). Alguns alvos previamente descritos da ADAR1 são os genes *AZIN1* e *NEIL1*, sendo o primeiro um regulador positivo de poliamida e o segundo uma enzima de reparo ao DNA (Eisenberg; Levanon, 2018). Outros estudos apontam para a recodificação do CCDC15, responsável por garantir a integridade dos centríolos (Tang et al., 2020). Desequilíbrios na expressão de ADAR1 foram previamente relacionados a uma série de patologias, como leucemias, câncer hepatocelular e doenças de acometimento do SNC, tais como depressão e diversos transtornos mentais, (Slotkin; Nishikura, 2013) (Crews et al., 2023) (Hartner et al., 2009).

A partir do panorama geral das principais modificações pós-transcricionais mais estudadas na atualidade, é relevante identificar o envolvimento de cada uma delas na LMA, com destaque para a delimitação de mecanismos e vias específicas. A compilação desses resultados se faz útil ao passo que facilita uma posterior identificação de possíveis alvos terapêuticos, necessários para o desenvolvimento de terapias mais específicas e eficientes.

Tabela 5: Síntese das informações principais de cada modificação. Autoral.

Modificações	Principais proteínas	Função
m6a	METTL3/14/16, WTAP, VIRMA, RBM15, ZC3H13, família IGF2BP, família YTH, família hnRNP, FTO, ALKBH5	Alterações em vias de metabolismo e diferenciação celular
m5c	NSUN1/2/3/6, DNMT2, TET2, AlyREF, YBX1	Estabilidade e exportação nuclear (3'UTR e 5"UTR)
m7g	METTL1, WDR4, RNMT, RAM	Tradução e exportação nuclear
ac4c	NAT10	Tradução e estabilidade (regiões codificantes)
A-to-I	ADAR1, ADAR2	Recodificação (3"UTR)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Compilar e descrever as modificações pós-transcricionais em mRNA previamente descritas no contexto da Leucemia Mieloide Aguda.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar as modificações em mRNA que já foram descritas na literatura;
- Avaliar quais dessas alterações foram previamente associadas com a LMA;
- Elencar os mecanismos associados ao fenótipo leucêmico em cada uma das modificações.

3 METODOLOGIA

O trabalho foi pautado na metodologia de revisão integrativa de literatura, que consiste na utilização de bancos de dados para selecionar na literatura existente o material que diz respeito ao tema proposto, seja ele composto por artigos de revisão, ensaios clínicos ou outros. As plataformas utilizadas para coleta dos artigos científicos foram PubMed e Scopus. Inicialmente, foram utilizados descritores para a seleção de modificações incidentes no mRNA, sendo eles: “RNA”; ‘mRNA’; “Epitrasncriptoma”; “Modificações em RNA” (Figura 9).

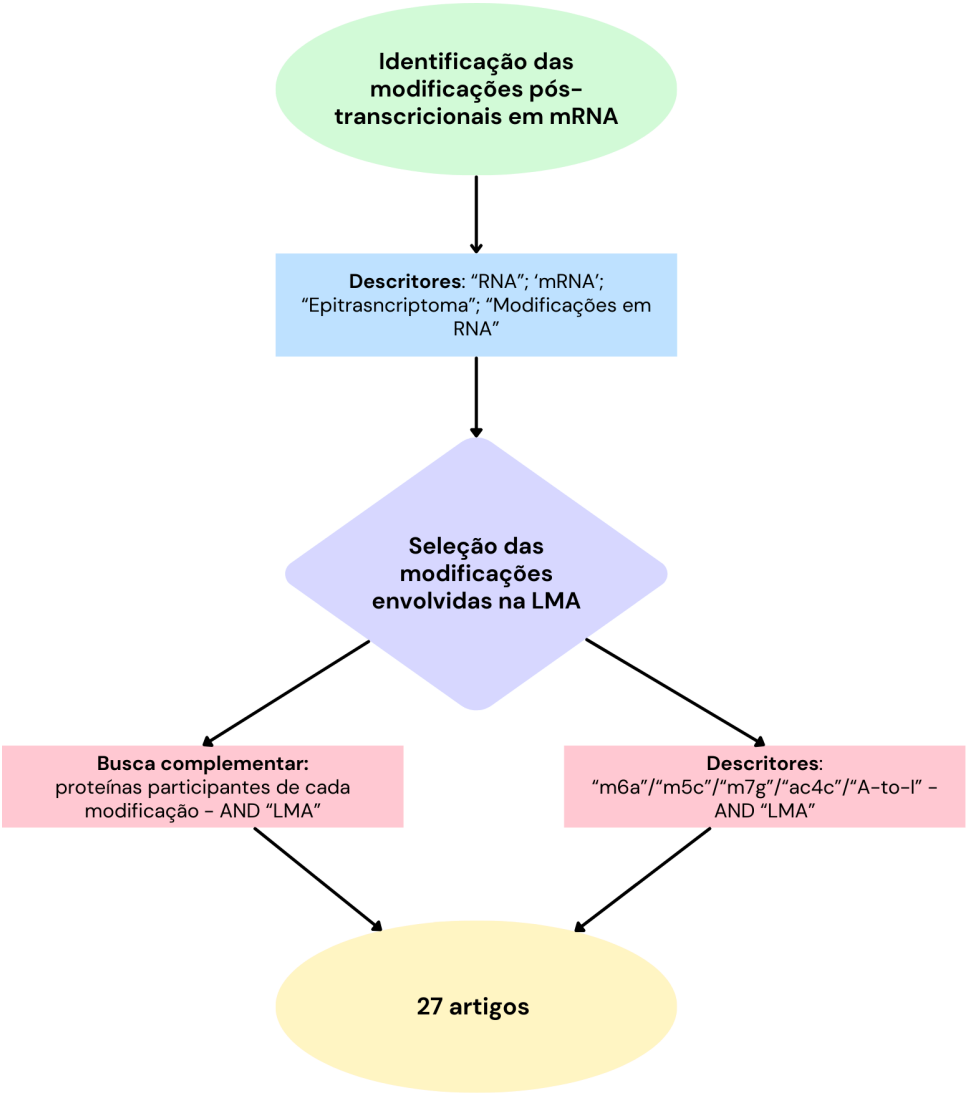

Figura 9: Fluxograma da metodologia empregada no estudo. Fonte: Autoral.

Uma vez delimitadas as alterações em mRNA, foram empregados descritores individuais para cada tipo de modificação, incluindo proteínas relacionadas, utilizando tanto siglas quanto seus nomes por extenso, seguidos do descritor “LMA”, com o auxílio do operador booleano “AND”, para restringir a busca apenas à modificações relacionadas à doença. Foram considerados artigos datados a partir de 2016, tanto em português quanto em inglês. Os critérios de exclusão consistiram na ausência de uma descrição específica do processo da modificação em associação com a Leucemia Mieloide Aguda, ou a falta de relação direta com o mRNA. Com base nos artigos restantes, totalizando 27 artigos, foi elaborada uma descrição e análise de seus resultados, e uma discussão sobre os mecanismos que estariam envolvidos na LMA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A disposição dos 27 artigos encontrados, abordando os mecanismos envolvidos na LMA de 5 modificações pós-transcricionais em mRNA (m5c, m7g, ac4c, A-to-I e m6a), encontra-se disponível na tabela 5.

Autor(es)	Título	Modificação	Referência
Barbieri et al., 2017	Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m6A-dependent translation control	m6a	1
Cheng et al., 2018	RNA cytosine methylation and methyltransferases mediate chromatin organization and 5-azacytidine response and resistance in leukaemia	m5c	2

Crews et al., 2023	Reversal of malignant ADAR1 splice isoform switching with Rebecsinib	A-to-I	3
Ding et al, 2024	5-methylcytosine RNA modification regulators-based patterns and features of immune microenvironment in acute myeloid leukemia	m5c	4
Elcheva et al., 2020	RNA-binding protein IGF2BP1 maintains leukemia stem cell properties by regulating HOXB4, MYB, and ALDH1A1	m6a	5
Ghram et al., 2023	The eukaryotic translation initiation factor eIF4E reprograms alternative splicing	m7g	6
Guo et al., 2023	Core-binding factor fusion downregulation of ADAR2 RNA editing contributes to AML leukemogenesis	A-to-I	7
Han et al., 2023	METTL16 drives leukemogenesis and leukemia stem cell self-renewal by reprogramming BCAA metabolism	m6a	8
Li et al., 2017	FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N6-Methyladenosine RNA Demethylase	m6a	9

Li et al., 2022	METTL3 mediates chemoresistance by enhancing AML homing and engraftment via ITGA4	m6a	10
Li et al., 2023	TET2-mediated mRNA demethylation regulates leukemia stem cell homing and self-renewal	m5c	11
Liang et al., 2020	NAT10 upregulation indicates a poor prognosis in acute myeloid leukemia	ac4c	12
Liao et al., 2023	m6A RNA methylation regulators predict prognosis and indicate characteristics of tumour microenvironment infiltration in acute myeloid leukaemia	m6a	13
Ma et al., 2023	SRSF2 plays an unexpected role as reader of m5C on mRNA, linking epitranscriptomics to cancer	m5c	14
Naren et al., 2022	High Wilms' tumor 1 associating protein expression predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia and regulates m6A methylation of MYC mRNA	m6a	15
Paris et al., 2019	Targeting the RNA m6A Reader YTHDF2 Selectively Compromises Cancer Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia	m6a	16

Rossetti et al., 2017	RNA editing signature during myeloid leukemia cell differentiation	A-to-I	17
Sang et al., 2022	The m6A RNA methyltransferase METTL3/METTL14 promotes leukemogenesis through the mdm2/p53 pathway in acute myeloid leukemia	m6a	18
Shen et al., 2020	RNA Demethylase ALKBH5 Selectively Promotes Tumorigenesis and Cancer Stem Cell Self-Renewal in Acute Myeloid Leukemia	m6a	19
Vu et al., 2017	The N 6 -methyladenosine (m 6 A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells	m6a	20
Weng et al., 2018	METTL14 Inhibits Hematopoietic Stem/Progenitor Differentiation and Promotes Leukemogenesis via mRNA m6A Modification	m6a	21
Weng et al., 2022	The m6A reader IGF2BP2 regulates glutamine metabolism and represents a therapeutic target in acute myeloid leukemia	m6a	22
Xiao et al., 2019	ADAR1 may be involved in the proliferation of acute myeloid leukemia cells via regulation of the wnt pathway	A-to-I	23

Zhang et al., 2022	The m6A reader IGF2BP3 promotes acute myeloid leukemia progression by enhancing RCC2 stability	m6a	24
Zhang et al., 2023	The role of m6A demethylase FTO in chemotherapy resistance mediating acute myeloid leukemia relapse	m6a	25
Zhang; Li; Wang, 2022	Transcriptome Profiling of N7-Methylguanosine Modification of Messenger RNA in Drug-Resistant Acute Myeloid Leukemia	m7g	26
Zi et al., 2020	Targeting NAT10 Induces Apoptosis Associated With Enhancing Endoplasmic Reticulum Stress in Acute Myeloid Leukemia Cells	ac4c	27

Tabela 6: Enumeração dos artigos selecionados, de acordo com o tipo de modificação a que se referem. Autoral.

A relação entre m5c e LMA foi mais intensamente investigada a partir dos anos 2010. Estudos identificaram hiperexpressão de 9 participantes da dinâmica regulatória da metilação[4]. As proteínas NSUN1, NSUN3, NSUN6, NSUN7, DNMT1, DNMT3A, TRDMT1, TET2 e TET3, além de se mostrarem mais expressas em contexto leucêmico, estariam positivamente correlacionadas e associadas a um pior prognóstico, enquanto as proteínas ALYREF, NSUN2 e NSUN5 estariam menos expressas em pacientes com LMA em relação a pacientes saudáveis em coorte TCGA. Avaliando o contexto mutacional de 17 das proteínas participantes da m5c (NSUN1, NSUN2, NSUN3, NSUN4, NSUN5, NSUN6, NSUN7, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TRDMT1, TET1, TET2, TET3, ALKBH1, ALYREF e YBX1), foi visto que DNMT3A e TET2 apresentam maior taxa mutacional, com 13% e 9%, respectivamente[4]. Além disso, TET2, NSUN2, DNMT3A/3B, por sua vez,

apresentaram uma redução na variação de número de cópias em relação a pacientes normais[4].

Abordando especificamente o papel da proteína NSUN2, foi avaliado que, em linhagens de LMA e LMMC (leucemia mielomonocítica crônica, havia uma baixa expressão do NSUN2, que se traduzia num baixo nível de m5c[14]. Além disso, o NSUN se mostrou relacionado ao SRSF2, fator de splicing responsável pelo splicing constitutivo e alternativo em uma diversidade de processos, inclusive nos relacionados à hematopoiese, além de participação na seleção do sítio de splicing (Wu et al., 2012). Foi constatada uma maior afinidade da SRSF2 pelo mRNA em contextos de NSUN2 alto[14].

Em cenários de mutações na SRSF2 (com destaque para a mutação P95H) e baixa expressão de NSUN2, os pacientes portadores de LMA apresentavam um pior prognóstico da doença[14]. Mutações no SRSF2 já foram relacionadas à síndrome mielodisplásica, sendo descritas alterações no padrão de splicing pela mudança na sequência de ligação com o alvo (Masaki et al., 2019). Dessa forma, se propõe a participação da SRSF2 como um reader da m5c, que realiza o seu processo de splicing a partir da leitura da metilação, e aponta uma possível relação com o fenótipo leucêmico.

Acerca do funcionamento de outras metilases, o papel de NSUN1, NSUN3 e DNMT2 como mediadores de sensibilidade/resistência a terapias foi relatado[2]. Foi inicialmente investigado o mecanismo de ação da 5-Azacitidina, medicamento amplamente utilizado para tratamento da LMA em pacientes com mais de 65 anos ou que não toleram a quimioterapia. Os resultados apontam para um mecanismo de ação voltado ao mRNA, uma vez que cerca de 90% do composto se mostra ligado a ele[2]. Nesse sentido, foi identificada a interação de NSUN3 e DMNT2 com a proteína hnRNPK, integrante de um grupo de proteínas de ligação ao mRNA previamente associado a splicing e tradução[2]. Essa interação proporciona a agregação de fatores de transcrição, dentre eles CDK9/P-TEFb, que recrutam a RNA polimerase II ativa, que por sua vez contribui para o remodelamento da cromatina favorável ao 5-AZA, necessário para susceptibilidade ao medicamento[08].

Por outro lado, num cenário de NSUN1 aumentado, ocorre o processo inverso, em que a interação entre ele e outros fatores de transcrição, como o BRD4, proporcionam um modelamento desfavorável da cromatina para a ação do 5-AZA através do recrutamento da RNA-pol-II ativa (Figura 10).

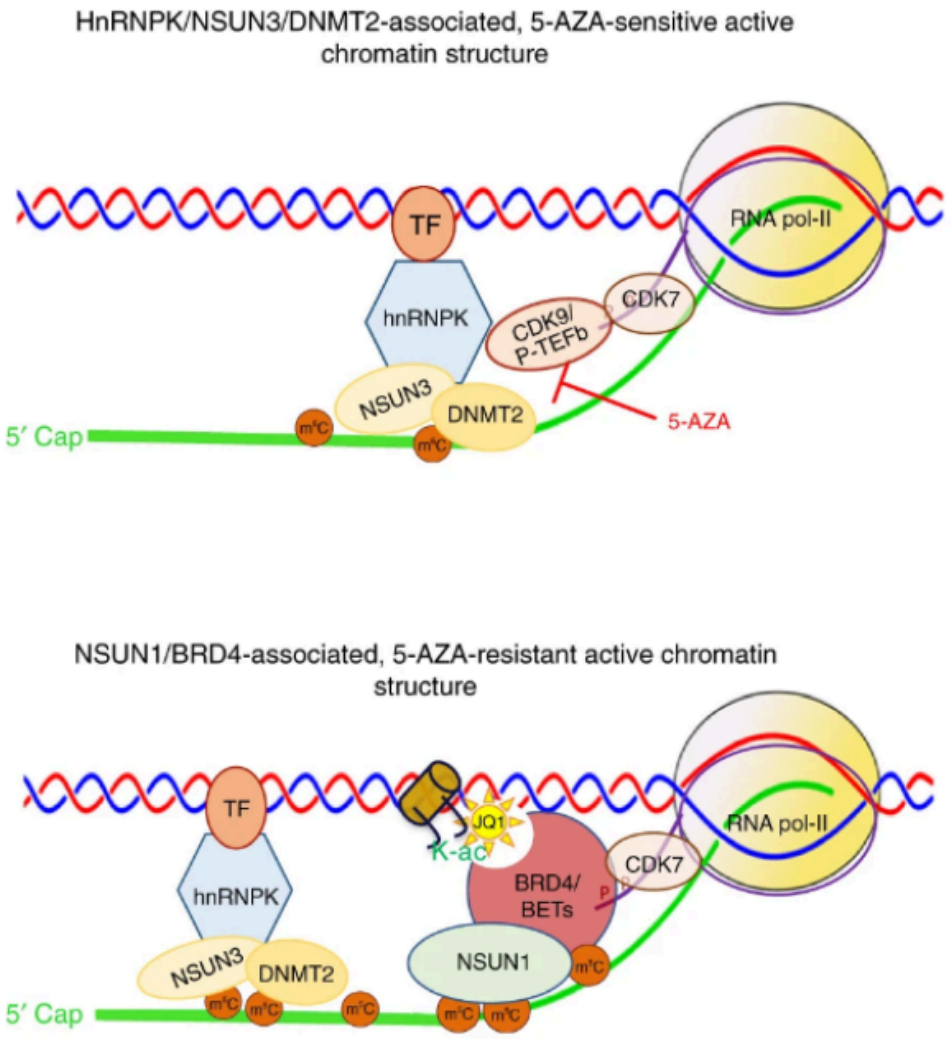

Figura 10: Modelo de ação do mecanismo m5c na estrutura da cromatina. A ligação entre NSUN3 e DNMT2 com hnRNPK promove recrutamento de CDK9/p-TEFb, provocando modificação da cromatina para que seja sensível ao 5-AZA (superior), enquanto NSUN1 recruta o complexo BRD4/BETs (inferior), tornando a cromatina resistente ao 5-AZA. Adaptado (Cheng et al., 2028).

A proteína TET2 já foi previamente associada a LMA (Pan et al., 2024) (Chen et al., 2011), mas geralmente não é evidenciado seu papel fisiológico como demetilase na m5c. Estudos recentes reiteraram a participação do TET2 na leucemogênese, com associação entre sua baixa expressão e sobrevida global inferior dos pacientes[11]. Dados de RNA-seq demonstram que a expressão de *TET2* reduzida está presente em subtipos mais imaturos de LMA em comparação com subtipos mais diferenciados[11]. Após experimentos executados em modelo murino, foi avaliado que, em cenários de deficiência de TET2, ocorre a estabilização do mRNA

de TSPAN13, que ao ligar-se com a YBX1 (reader m5c), ativa a via de sinalização CXCR4/CXCL12, responsável por mediar processos tais como autorrenovação e migração/ancoramento no nicho ideal para a célula tronco leucêmica[11] (Figura 11).

A TSPAN13 é uma proteína transmembrana que medeia vias de sinalização importantes para diferenciação, crescimento e mobilidade celular. Sua alta expressão foi relacionada a outros tipos de câncer, como de mama (Wang et al., 2029) e tireóide (Li; Dong; Wang, 2019). No entanto, não existem dados publicados sobre seu papel na LMA de maneira mais aprofundada.

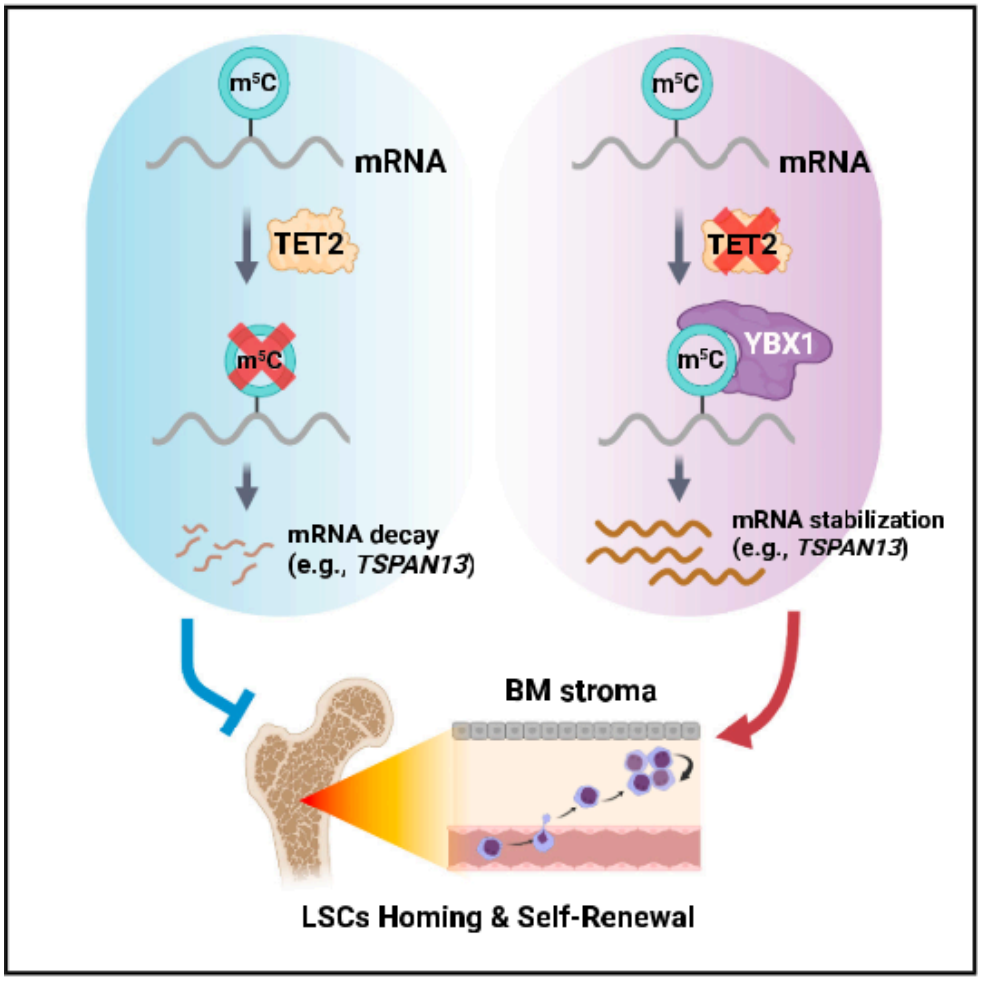

Figura 11: Mecanismo de contribuição da TET2 para o fenótipo leucêmico. Na presença de TET2, transcritos contendo m5c são demetilados, promovendo decaimento do mRNA alvo (esquerda). Na ausência ou mutação de TET2, torna-se inviável a remoção da m5c, levando a estabilização e ligação com YBX1, reader m5c (direita). Esse processo ocorre em alvos como TSPAN13, responsável por processos de autorrenovação e ancoramento das CTLs ao nicho medular. (Li et al., 2023).

Até o momento, o material disponível na literatura a respeito da modificação m7g em mRNA relacionada à LMA é limitado. Após a criação de um perfil m7g em linhagens de LMA (comuns e multirresistentes a drogas), foi avaliado que as linhagens compartilhavam de apenas 27% de genes modificados, e que havia um conteúdo de m7g significativamente maior nas HL-60 MX2 (resistentes a drogas) em relação às HL-60 (comum), sugerindo uma possível participação desta metilação no processo de resistência a medicamentos[26]. O protooncogene ARAF se mostrou hipermetilado em linhagens resistentes a fármacos, enquanto o gene *ERCC6* se apresentava hipometilado[26].

O gene ARAF é um inibidor de proteína quinase, relacionado a regulação negativa da apoptose e mediação de processos metabólicos (Su et al., 2022). A proteína codificada pelo gene *ERCC6* está relacionada principalmente à atividade de reparo do DNA, e já foi descrita como participante na progressão de câncer de pulmão (Luo et al., 2023). É necessário um aprofundamento acerca da participação desses genes na LMA, bem como da situação funcional mediante o status de metilação.

A expressão de eIF4E mostrou-se relacionada à exportação nuclear de fatores de splicing, de forma a aumentar sua capacidade de interação com a maquinaria necessária para formação do spliceossomo[6]. Num contexto de alta expressão de eIF4E, foi constatada a presença elevada dos fatores de splicing em amostras de pacientes com LMA. A partir desse resultado, foi elaborada a hipótese de que esse processo seria mediado pela metilação m7g, através de mecanismos já conhecidos e previamente constatados na literatura, em que o eIF4E se liga na extremidade 5' Cap e contribui na exportação nuclear e estabilização do alvo. Foram identificadas interações entre a proteína e 20 fatores de splicing, dentre eles: PRPF3, PRPF8, PRPF4B, PRPF39, PRPF31, PRPF6, PRPF40A, SF1, SRSF10, SF3B3, SF3B2, SRSF5 e U2AF1[6].

Além disso, num cenário de depleção de eIF4E, foi observado que as interações com PRPF6, U2AF3, SF3B1 e ELAVL1 diminuíram cerca de 5 vezes[6]. Num contexto de alta expressão de eIF4E, mostraram-se hiperexpressos os fatores PRPF6, PRPF8, PRPF19, SF3B1, U2AF1, U2AF2, SNRNP200A[6]. Dessa forma, dentre os fatores avaliados, o fator de splicing que acompanha a expressão de eIF4E é o PRPF6. Essa proteína está relacionada ao processamento de pré-mRNA e intimamente ligada à formação do spliceossomo (Song et al., 2020).

A programação de splicing de células com alto conteúdo de eIF4E se mostraram focadas principalmente em processos de ciclo celular, reparo de DNA, tráfego de membrana, modificações em cromatina, ativação de MYC e metabolismo de RNA[6]. Com isso, é fundamentada a hipótese de que a expressão de eIF4E, bem como os níveis de m7g, estão relacionados com a exportação e destino de fatores de splicing. Mais estudos devem ser realizados para a avaliação do impacto desses fatores no prognóstico e sobrevida de pacientes com LMA.

A modificação ac4c foi descrita no contexto de LMA apenas a partir de 2020. Estudos realizados identificaram uma alta expressão de NAT10 em pacientes com LMA em relação a pacientes saudáveis[12,27], bem como maior quantidade da proteína[27]. Além disso, mediante uma avaliação de mutações em genes relacionados ao prognóstico, tais como *NPM1* e *FLT3*, foi constatado que NPM1-mutado está acompanhado de uma maior expressão de NAT10 em relação aos pacientes NPM1-WT[12].

Na análise de sobrevida global e sobrevida livre de doença, dois dos desfechos corriqueiramente avaliados em pacientes com LMA, após estratificação da coorte em 2 grupos: o grupo de alta expressão e o grupo de baixa expressão de NAT10. Foram verificadas taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença inferiores no grupo NAT10-alto em relação ao grupo NAT10-baixo[12, 27]. Na realização de ensaios com shRNA (short-hairpin RNA), foi constatado que o silenciamento de NAT10 provocou uma redução na proliferação celular e aumento de apoptose em linhagens de LMA[27].

Esse dado foi acompanhado da redução de CDK2, CDK4, Ciclina D1 e Ciclina E[27]. As proteínas quinases CDK2 e CDK4, juntamente com as ciclinas Ciclina D1 e Ciclina E que realizam a regulação do processo coordenam o processo de iniciação da replicação do DNA e transição entre as fases G1 e S, e a alta expressão delas é comum em diversos tipos de câncer (Gallo et al., 2022). Além dessas proteínas, foi verificado o aumento de GRP78, proteína que marca o estresse do retículo endoplasmático (RE), bem como supressão da proteína AKT, responsável por reduzir o estresse no RE, e aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas[27]. O estresse no RE desencadeia a ação de caspases promotoras da apoptose através de dois eixos distintos (Figura 12) (Han et al., 2013).

No contexto de mRNA, a modificação A-to-I tem como sua principal proteína executora a ADAR1. A existência e o equilíbrio entre as duas isoformas da ADAR1

(p150 e p110) no ambiente celular também foi alvo de estudos no contexto da LMA. A presença de citocinas inflamatórias contribui para a troca das isoformas ADAR1p110 para ADAR1p150, que demonstrou participação na transformação leucêmica, principalmente em LMA secundária[3]. Além disso, a presença dessa isoforma contribui com resistência terapêutica a uma diversidade de tratamentos[3].

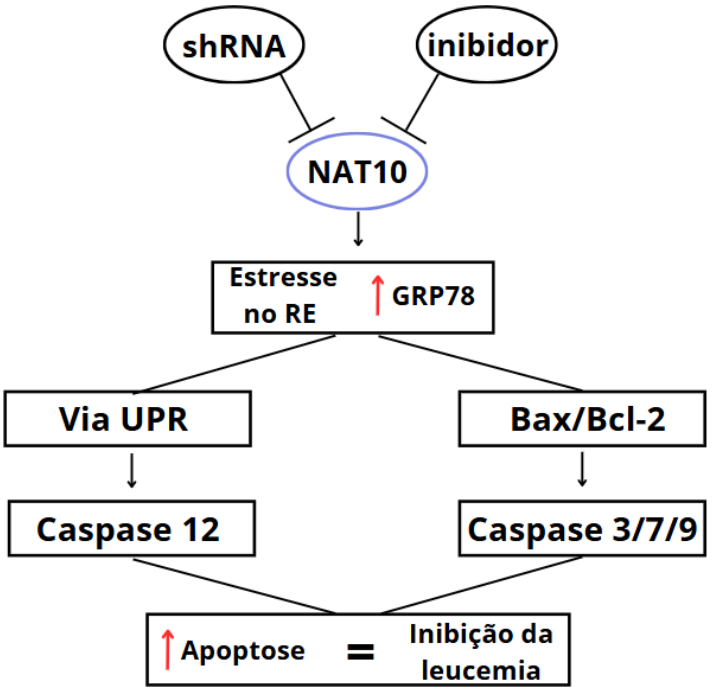

Figura 12: Mecanismo pró-apoptótico mediado pela redução de NAT10. A redução de NAT10, seja por shRNA ou inibidor farmacológico, provoca um aumento do estresse no retículo endoplasmático (RE), marcado pela proteína GRP78, que desencadeia a atividade das vias UPR e Bax/Bcl, culminando na apoptose e redução do fenótipo leucêmico. Adaptado (Zi et al., 2020).

No entanto, as outras proteínas da família ADAR, como a ADAR2, também possuem atividade em mRNA, com participação na LMA relatada na literatura[7]. Os dados disponíveis na literatura acerca da expressão e participação da ADAR1 na LMA são divergentes. Em uma coorte chinesa composta por 101 pacientes diagnosticados com LMA, foi identificada uma maior expressão de ADAR1 em relação ao grupo controle[23]. Além disso, utilizando de linhagens de LMA, foi verificada a redução da proliferação celular após o silenciamento do ADAR1, bem como diminuição na expressão de genes relacionados à via de sinalização wnt, como β-catenina, c-Myc, TCF4[23].

Essa via está relacionada à progressão da LMA, sendo necessária para o processo de autorrenovação e sobrevivência das CTLs (Gruszka; Valli; Alcalay, 2019). Entretanto, outros estudos apontam que, embora a ADAR1 não esteja expressa diferencialmente em pacientes com LMA em comparação ao grupo controle [9,17], sua presença é necessária para o processo de diferenciação celular e manutenção dos blastos[17]. Durante esse processo, também foi avaliado a regulação positiva entre ADAR1 e seus alvos (AZIN1 e CCNI), de maneira similar ao que ocorre com ADAR2 e COG3[17]. Edições nos alvos da ADAR1 foram previamente caracterizados em outros tipos de câncer (Ghalali et al., 2022; Zhang et al., 2022).

A respeito da ADAR2, pesquisas apontam para um papel preponderante na regressão da LMA, principalmente na presença dos genes de fusão *CBFb-MYH11* e *RUNX1-RUNX1T1*, que compõem uma subclassificação denominada *CBF leukemia*[7]. Nesse contexto, foi identificada uma baixa expressão de ADAR2 em amostras de pacientes com LMA quando comparadas a amostras de pacientes saudáveis[7]. Essa diminuição hipoteticamente é provocada pelo próprio gene de fusão *RUNX1-RUNX1T1*, que compete com sua forma comum *RUNX1*, ativador transcricional da ADAR2[7].

Dessa forma, avaliou-se que a restauração de ADAR2 contribui para a prevenção da leucemogênese, principalmente pela edição de alvos como COG3 e COPA[7] (Figura 13). Ambos os genes estão relacionados ao transporte de proteínas entre o Complexo de Golgi e o retículo endoplasmático[7]. Na avaliação das formas editadas desses genes, nota-se a capacidade de inibição da clonogenicidade em linhagens de *CBF leukemia*[7]. Com base nestes dados, sugere-se que, a partir da expressão aumentada de ADAR2, esta seja capaz de catalisar a modificação A-to-I em seus alvos, recodificando as proteínas pela mudança do nucleotídeo. Dessa forma, seriam geradas proteínas COG3 e COPA editadas, detentoras de um potencial anti leucêmico que deve ser melhor elucidado por novos estudos.

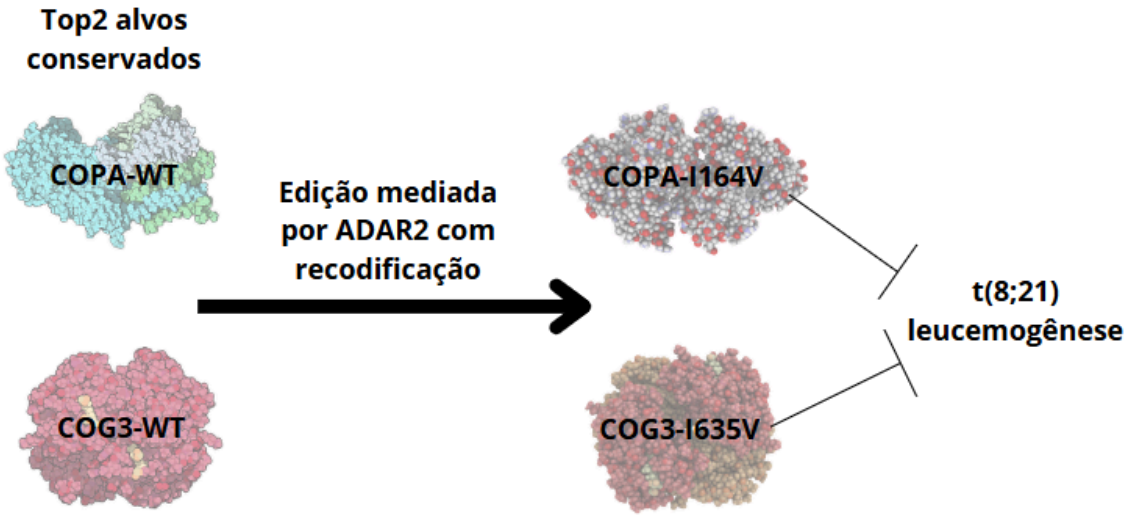

Figura 13: Edição dos alvos COG3 e COPA pela ADAR2. Após formado o nucleotídeo inosina, as proteínas adquirem potencial de inibição da leucemogênese na presença da t(8;21)/ *RUNX1/RUNX1T1*. Adaptado (Guo et al., 2023).

Das alterações pós transcricionais em mRNA, a m6a é a modificação mais bem descrita e abordada, inclusive tratando-se da LMA. A maioria dos elementos que compõem a maquinaria da metilação já foi relacionada a diversos processos de proliferação, mecanismos anti-apoptóticos e de parada na diferenciação celular. Acerca das metiltransferases ou writers, recebe destaque o complexo METTL3/14, em que a maioria dos estudos aponta para sua alta expressão na LMA, que costuma estar associada a um pior prognóstico por parte dos pacientes[18,20,21].

A diminuição de ambos METTL3 e METTL14 em linhagens celulares promove diminuição da proliferação, parada do ciclo celular e aumento da apoptose[18]. A atividade proliferativa proporcionada por esse complexo está ligada à metilação de MDM2[18], proteína que regula negativamente o supressor de tumor *p53* (Brummer; Zeiser, 2024). Consequentemente, o mRNA de MDM2 permaneceria estável por um tempo maior, permitindo a perpetuação de sua atividade, causando problemas no ciclo celular pelo comprometimento da via MDM2/p53.

Outros alvos da metilação que podem estar relacionados ao fenótipo leucêmico são SP1/SP2[1], PTEN[20] e ITGA4[10] cujas taxas de tradução estão intimamente relacionadas com a atividade metiladora da METTL3, devido ao aumento na estabilidade do transcrito. A proteína SP1 regula positivamente a expressão de

c-Myc, permitindo a ligação de seus promotores[1]. O c-Myc é um fator de transcrição que exerce um papel importante na leucemogênese, inibindo a diferenciação terminal e estimulando a proliferação (Delgado et al., 2013). Além desse mecanismo, foi apontado que o aumento da expressão de MYC está relacionado com a METTL14, diretamente através de sua metilação[21].

Pesquisas realizadas com enfoque na METTL14 apontam que a metilação de MYB e MYC aumentam a estabilidade de seu mRNA, contribuindo com os efeitos da alta expressão de ambos[20,21]. A alta expressão de MYB, que também se qualifica como um fator transcricional oncogênico (Cicirò; Sala, 2021), inibe a diferenciação da linhagem mieloide, enquanto as altas taxas de MYC intensificam processos de autorrenovação e crescimento celular[21]. Em contrapartida, o gene PTEN é um regulador negativo de pAKT, oncogene membro da via PI3K/AKT, que tem efeitos de regulação do metabolismo[20].

A intensificação dessa via costuma está relacionada a um aumento no metabolismo de glicose, processo necessário para proliferação e sobrevivência celular que costuma ter associação com prognósticos adversos. Um processo similar ocorre pela ação da WTAP, outra proteína participante na execução da m6a, que demonstra aumento na sua expressão em indivíduos com LMA em relação aos saudáveis, acompanhada de uma menor taxa de sobrevida global por parte do grupo[15]. No entanto, pelo fato da via participar de outras interações que regulam atividades diversas, o panorama mutacional de outras proteínas pode contribuir para outros desfechos (Nepstad et al., 2020). O aumento da ITGA4, proteína integrina que participa de processos como sinalização e adesão celular, mostrou provocar uma remodelação no microambiente da medula óssea, contribuindo para processos de resistência à quimioterapia[10].

Além do complexo principal, a maquinaria de metiltransferases é complementada pela presença de uma série de outras proteínas. As proteínas ZC3H13 e RBM15 mostraram-se diferencialmente expressas entre pacientes com LMA e pacientes controle, com sua alta expressão relacionada a um pior prognóstico[13]. A metiltransferase METTL16, embora não esteja integrada na maquinaria ordinária de m6a e tenha sua atividade majoritariamente vinculada a outros tipos de RNA, exerce atividade de metilação em alvos relacionados a LMA, tais como BCAT1 e BCAT2[8].

Essas enzimas são responsáveis por catalisar a transaminação dos BCAAs, formando alfa-cetoácidos de cadeia ramificada, cuja participação na LMA foi tem

relação com regulação epigenética positiva de genes relacionados a *stemness* (fenótipo leucêmico indiferenciado), além de servirem de substrato na formação de proteínas e combustível para a fosforilação oxidativa necessária para manutenção do fenótipo leucêmico (Kikushige et al., 2023). A formação do glutamato como produto da transaminação contribui para a síntese *de novo* de nucleotídeos, essencial para o processo de divisão celular acentuada. A metilação desses alvos, que é lida principalmente pelo reader YTHDC1, leva ao aumento de disponibilidade, e posteriormente à reprogramação do metabolismo de BCAAs na CTL[8] (Figura 14).

A respeito da contribuição das demetilases m6a na LMA, ambas (FTO e ALKBH5) tiveram seus papéis e alvos definidos. A ALKBH5 mostrou-se altamente expressa na LMA, e foi indicada sua possível relação com a expressão de *TACC3*[19]. Essa proteína regula a expressão de *MYC* e *p21* (supressor de tumor de ação conjunta à p53) (Engeland, 2022). A alta expressão de ALKBH5 leva ao aumento de TACC3 pela estabilização de seu mRNA, processo inverso ao que geralmente é identificado pelos alvos de m6a. Isso leva ao aumento de MYC e diminuição de p21, contribuindo para o processo de proliferação celular e autorrenovação[19].

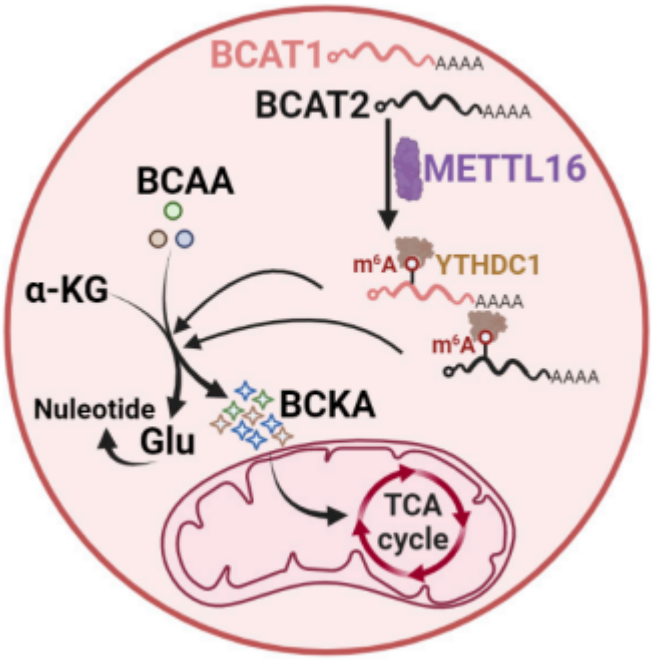

Figura 14: Atividade do METTL16 sob os alvos BCAT1 e BCAT2. A metilação promove incremento no metabolismo de BCAAs, promovendo a formação de BCKAs e glutamato, que alimentam o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e biossíntese de nucleotídeos, respectivamente. Adaptado (Han et al., 2023).

Dados apontam para a contribuição da alta expressão de FTO para processos de transformação leucêmica e supressão da apoptose em linhagens de LMA, mediados por genes como PML-RARA, FLT3-ITD e NPM1 mutado[9]. No cenário da LPA, a demetilação de seus alvos induz uma regulação negativa de suas expressões, situação que ocorre com os genes ASB2 (responsável pela degradação de certas proteínas) e RARA[9], bem como FOXO3 (relacionado a diferenciação celular)[25]. Esse mecanismo contribui para resistência do tratamento com base em ATRA, que atua inibindo o gene de fusão PML-RARA na LPA e induzindo a diferenciação terminal (Zhou et al., 2005).

Sobre a possível relação das proteínas de ligação com a LMA, os 3 principais membros da família IGF2BP (IGF2BP1/2/3) e YTHDF2 recebem destaque. De forma similar às metilases e demetilases, o aumento de proteínas pertencentes à classe dos readers costuma representar um fator de mau prognóstico para pacientes com LMA, uma vez que elas promovem diminuição da meia-vida de seus alvos. Essa mecânica ocorre, por exemplo, com o YTHDF2 em relação ao gene TNFRSF1B, codificador dos receptores TNFR1 e TNFR2[16]. Esse gene costuma estar menos expresso em pacientes com LMA, e suas proteínas contribuem com a limitação da capacidade de autorrenovação das CTLs (Höckendorf et al., 2016).

A proteína IGF2BP1, bem como as outras participantes da família IGF2BP, encontra-se hiperexpressa em algumas linhagens de LMA[24,5,22]. Foi constatado que a presença de IGF2BP1 está associada ao potencial proliferativo das CTLs, possivelmente devido ao aumento da expressão de genes essenciais que atuam a favor do estado leucêmico, como é o caso de ALDH1A1, HOXB4 e MYB[5]. A primeira estaria relacionada com processos de metabolismo de drogas, dificultando o mecanismo de ação de terapias farmacológicas pela proteção das CTLs contra os agentes alquilantes (Gasparetto; Smith, 2017). Já as duas últimas demonstram contribuir para o bloqueio da diferenciação celular e autorrenovação (Umeda et al., 2012; Cicirò; Sala, 2021).

O IGF2BP2 atua na identificação da metilação de alvos envolvidos no metabolismo celular, de maneira aparentemente complementar à METTL16. Seu funcionamento como reader da m6a contribui para o funcionamento dos genes MYC (cujo mecanismo de ação foi previamente descrito), SLC1A5 e GPT2[22]. Os dois últimos estão ligados à atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, através da

facilitação da entrada de glutamina e transaminação do glutamato para formação de alfacetoglutarato, respectivamente[22]. Por fim, o IGF2BP3 regula positivamente,por mecanismos m6a-dependentes, a expressão de RCC2, que está relacionada a um pior prognóstico da doença[24]. A depleção forçada dessa proteína contribuiu para aumento da apoptose em diversas linhagens celulares[24].

5 CONCLUSÃO

Após a seleção e avaliação das modificações pós transcricionais em mRNA mais relevantes na LMA, conclui-se que as modificações mais relevantes no contexto da LMA estão relacionadas, em alguma medida, a vias de proliferação, metabolismo e bloqueio na diferenciação celular, dando continuidade ao processo da leucemogênese. Foram elencados os principais mecanismos interferentes no fenótipo leucêmico, resultantes do funcionamento e, principalmente, do desequilíbrio entre as proteínas que compõem suas maquinarias individuais. Foi verificado que o efeito causado pela modificação, e como ele contribui para a manutenção e progressão da LMA, depende intimamente do alvo a ser considerado. A maioria dos estudos opta por abordar as vias celulares individualmente, a fim de avaliar seu impacto em contextos específicos. No entanto, levando em consideração a diversidade de interações simultâneas entre componentes celulares, se faz útil a análise de um contexto mais amplo para torná-la mais fidedigna. Em geral, as pesquisas avaliadas sugerem alvos que interferem negativamente no prognóstico dos pacientes, seja a partir da intensificação ou da redução das diversas modificações. É necessário o aprofundamento das pesquisas para o esclarecimento das funções individuais de cada alvo no panorama da LMA, além de dar continuidade à descoberta de novas modificações relevantes para a doença.

REFERÊNCIAS

ARANGO, Danie *et al*. Direct epitranscriptomic regulation of mammalian translation initiation through N4-acetylcytidine. **Molecular Cell**, v. 82, n. 15, p. 2797-2814.e11, ago 2022.

ARANGO, Daniel; *et al*. Acetylation of Cytidine in mRNA Promotes Translation Efficiency. **Cell**, v. 175, n. 7, p. 1872-1886.e24, dez 2018.

ARBER, Daniel A *et al*. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–405, mai 2016.

ARZUMANIAN, Viktoriia A; *et al*. Epitranscriptome: Review of Top 25 Most-Studied RNA Modifications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 13851–13851, nov 2022.

ATHANASIADIS, Alekos; RICH, Alexander ; MAAS, Stefan. Widespread A-to-I RNA Editing of Alu-Containing mRNAs in the Human Transcriptome. **PLoS Biology**, v. 2, n. 12, p. e391, nov 2004.

BAKHURAYSAH, Maha M.; SIATSKAS, Christopher ; PETRATOS, Steven, Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it a clinical reality?, **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, fev 2016.

BARBIERI, Isaia; *et al*. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m6A-dependent translation control. **Nature**, v. 552, n. 7683, p. 126–131, dez 2017.

BAZAK, Lily; *et al*. A-to-I RNA editing occurs at over a hundred million genomic sites, located in a majority of human genes. **Genome Research**, v. 24, n. 3, p. 365–376, dez 2013.

BORELLA, Giulia; *et al*. Targeting mesenchymal stromal cells plasticity to reroute acute myeloid leukemia course. **Blood**, mai 2021.

BOSCARO, Elisa *et al*. Modern Risk Stratification of Acute Myeloid Leukemia in 2023: Integrating Established and Emerging Prognostic Factors. **Cancers**, v. 15, n. 13, p. 3512–3512, jul 2023.

CARTLIDGE, Robert A; *et al*. The tRNA methylase METTL1 is phosphorylated and inactivated by PKB and RSK in vitro and in cells. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 9, p. 1696–1705, abr 2005.

CALVANESE, Vincenzo ; MIKKOLA, Hanna. The genesis of human hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 142, n. 6, p. 519–532, ago 2023.

CHELLAMUTHU, Anitha ; GRAY, Steven G. The RNA Methyltransferase NSUN2 and Its Potential Roles in Cancer. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1758, jul 2020.

CHEN, Pengyin; *et al*. Global, national, and regional burden of acute myeloid leukemia among 60–89 years-old individuals: insights from a study covering the period 1990 to 2019. **Frontiers in Public Health**, v. 11, jan 2024.

CHEN, Yongfeng; *et al*. The genesis and evolution of acute myeloid leukemia stem cells in the microenvironment: From biology to therapeutic targeting, **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, set 2022.

CHENG, Jason X. *et al*. RNA cytosine methylation and methyltransferases mediate chromatin organization and 5-azacytidine response and resistance in leukaemia. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1163, mar 2018.

CHENG, Ying; *et al*. Decoding m6A RNA methylome identifies PRMT6-regulated lipid transport promoting AML stem cell maintenance. **Cell Stem Cell**, v. 30, n. 1, p. 69-85.e7, jan 2023.

CHUNG, Hachung; *et al*. Human ADAR1 Prevents Endogenous RNA from Triggering Translational Shutdown. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 811-824.e14, fev 2018.

CICIRÒ, Ylenia; SALA, Arturo. MYB oncoproteins: emerging players and potential therapeutic targets in human cancer. **Oncogenesis**, v. 10, n. 2, fev 2021.

CRAIG, Fiona; FOON, Kenneth. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941–3967, jan 2008.

CREWS, Leslie A; *et al*. Reversal of malignant ADAR1 splice isoform switching with Rebecsinib. **Cell Stem Cell**, v. 30, n. 3, p. 250-263.e6, mar 2023.

DELGADO, M. Dolores; *et al*. MYC oncogene in myeloid neoplasias. **Clinical and Translational Oncology**, v. 15, n. 2, p. 87–94, fev 2012.

DESAI, Rhea H.; ZANDVAKILI, Niloofar ; BOHLANDER, Stefan K. Dissecting the Genetic and Non-Genetic Heterogeneity of Acute Myeloid Leukemia Using Next-Generation Sequencing and In Vivo Models. **Cancers**, v. 14, n. 9, p. 2182, abr 2022.

DING, Yuhong; *et al.* 5-methylcytosine RNA modification regulators-based patterns and features of immune microenvironment in acute myeloid leukemia. **AGING**, v. 16, n. 3, p. 2340-2361, fev 2024.

DÖHNER, Hartmut; *et al*. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel. **Blood**, v. 140, n. 12, jul 2022.

DÖHNER, Hartmut; *et al*. Diagnosis and Management of AML in adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. **Blood**, v. 129, n. 4, p. 424–447, nov 2016.

DÖHNER, Hartmut; WEISDORF, Daniel J. ; BLOOMFIELD, Clara D. Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136–1152, set 2015.

DOHNER, Konstanze. ; DOHNER, Hartmut. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 93, n. 7, p. 976–982, jan 2008.

DOMINISSINI, Dan; *et al*. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 201–6, 2012.

DOULATOV, Sergei; *et al*. Hematopoiesis: A Human Perspective. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 2, p. 120–136, fev 2012.

DU, Ashuai; *et al*. m6A Regulator-Mediated Methylation Modification Patterns and Tumor Microenvironment Infiltration Characterization in Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Immunology**, v. 12, nov 2021.

DU, Hao; *et al*. YTHDF2 destabilizes m 6 A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4–NOT deadenylase complex. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–11, ago 2016.

DUPONT, Cathérine; ARMANT, D. Randall; BRENNER, Carol. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective, **Seminars in Reproductive** Medicine, v. 27, n. 05, p. 351–357, ago 2009.

EISENBERG, Eli ; LEVANON, Erez Y. A-to-I RNA editing — immune protector and transcriptome diversifier. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 8, p. 473–490, abr 2018.

EISFELD, A.-K.; *et al*. Mutations in the CCND1 and CCND2 genes are frequent events in adult patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 31, n. 6, p. 1278–1285, jun 2017.

ELCHEVA, Irina A; *et al*. RNA-binding protein IGF2BP1 maintains leukemia stem cell properties by regulating HOXB4, MYB, and ALDH1A1. **Leukemia**, v. 34, n. 5, p. 1354–1363, nov 2019.

ENGELAND, Kurt. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 29, n. 5, p. 1–15, mai 2022.

ESTEVE-PUIG, Rosaura; BUENO-COSTA, Alberto; ESTELLER, Manel. Writers, readers and erasers of RNA modifications in cancer. **Cancer Letters**, v. 474, p. 127–137, abr 2020.

FU, Ye; *et al*. Gene expression regulation mediated through reversible m6A RNA methylation. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 5, p. 293–306, mar 2014.

GALLO, David; *et al*. CCNE1 amplification is synthetic lethal with PKMYT1 kinase inhibition. **Nature**, v. 604, n. 7907, p. 749–756, abr 2022.

GASPARETTO, Maura.; SMITH, Clayton. A. ALDHs in normal and malignant hematopoietic cells: Potential new avenues for treatment of AML and other blood cancers. **Chemico-Biological Interactions**, v. 276, p. 46–51, jun. 2017.

GHALALI, Aram; *et al*. AZIN1 RNA editing alters protein interactions, leading to nuclear translocation and worse outcomes in prostate cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 54, n. 10, p. 1713–1726, out 2022.

GHRAM, Mehdi; *et al*. The eukaryotic translation initiation factor eIF4E reprograms alternative splicing. **The EMBO Journal**, v. 42, n. 7, p. e110496, abr 2023.

GOLDMAN, Samantha L.; *et al*. Epigenetic Modifications in Acute Myeloid Leukemia: Prognosis, Treatment, and Heterogeneity. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019.

GROZHIK, Anya V; *et al*. Mapping m6A at Individual-Nucleotide Resolution Using Crosslinking and Immunoprecipitation (miCLIP). **Methods in molecular biology**, p. 55–78, jan 2017.

GRUSZKA, Alicja M.; VALLI, Debora ; ALCALAY, Myriam. Wnt Signalling in Acute Myeloid Leukaemia. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1403, nov 2019.

GUO, Mingrui; *et al*. Core binding factor fusion downregulation of ADAR2 RNA editing contributes to AML leukemogenesis. **Blood**, fev 2023.

GUSSAKOVSKY, Daniel ; MCKENNA, Sean A. Alu RNA and their roles in human disease states. **RNA Biology**, v. 18, n. sup2, p. 574–585, out 2021.

HAFNER, Markus *et al*. Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 129–141, abr 2010.

HAN, Jaeseok; *et al*. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 481–490, mai 2013.

HAN, Li; CHEN, Jianjun; SU, Rui. Epitranscriptomics in myeloid malignancies. **Blood Science**, v. 4, n. 3, p. 133–135, jul 2022.

HAN, Li; *et al*. METTL16 drives leukemogenesis and leukemia stem cell self-renewal by reprogramming BCAA metabolism. **Cell Stem Cell**, v. 30, n. 1, p. 52-68.e13, jan 2023.

HARTNER, Jochen C; *et al*. ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling. **Nature Immunology**, v. 10, n. 1, p. 109–115, dez 2008.

HOCHMAN, Michael J *et al*. Prognostic Impact of Secondary Versus De Novo Ontogeny in Acute Myeloid Leukemia (AML) Is Predominantly Accounted for By the European Leukemianet (ELN) 2022 Risk Classification. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 1430–1432, nov 2022.

HÖCKENDORF, Ulrike; *et al*. RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. **Cancer Cell**, v. 30, n. 1, p. 75–91, jul 2016.

HONG, Juyeong; XU, Kexin ; JI HOON LEE. Biological roles of the RNA m6A modification and its implications in cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 54, n. 11, p. 1822–1832, nov 2022.

HONG, Yun-Guang; *et al*. The RNA m6A reader YTHDF1 is required for acute myeloid leukemia progression. **Cancer Research**, v. 83, n. 6, p. 845–860, jan 2023.

HOPE, Kristin J; JIN, Liqing ; DICK, John E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. **Nature Immunology**, v. 5, n. 7, p. 738–743, nov 2004.

HUANG, Huilin; *et al*. Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 285–295, mar 2018.

HUANG, Tao; *et al*. Genome-wide identification of mRNA 5-methylcytosine in mammals. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 380–388, mai 2019.

HUSSAIN, Shobbir. Characterizing 5-methylcytosine in the mammalian epitranscriptome. **Genome Biology**, v. 14, n. 215, 2013.

ISSAH, Mohammed; *et al*. Epigenetic modifications in acute myeloid leukemia: The emerging role of circular RNAs (Review). **International Journal of Oncology**, v. 59, n. 6, nov 2021.

JIANG, Xiulin; *et al*. The role of m6A modification in the biological functions and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–16, fev 2021.

KANTARJIAN, Hagop *et al*. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. **Blood Cancer Journal**, v. 11, n. 2, fev 2021.

KE, Shengdong; *et al*. A majority of m^6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3′ UTR regulation. **Genes & Development**, v. 29, n. 19, p. 2037–2053, set 2015.

KHOURY, Joseph D. *et al*. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703–1719, jun 2022.

KIKUSHIGE, Yoshikane; *et al*. Human acute leukemia utilizes branched-chain amino acid catabolism to maintain stemness through regulating PRC2 function. **Blood Advances**, v. 7, n. 14, p. 3592–3603, jul 2022.

KLEINBERGER, Yoav ; EISENBERG, Eli. Large-scale analysis of structural, sequence and thermodynamic characteristics of A-to-I RNA editing sites in human Alu repeats. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 453, jul 2010.

KNUCKLES, Philip; *et al*. Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m6A machinery component Wtap/Fl(2)d. **Genes & Development**, v. 32, n. 5-6, p. 415–429, mar 2018.

LACAUD, Georges ; KOUSKOFF, Valerie. Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. **Experimental Hematology**, v. 49, p. 19–24, mai 2017.

LAGUNAS-RANGEL, Francisco; *et al*. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 11, n. 4, p. 327-339, out 2017.

LÁINEZ-GONZÁLEZ, Daniel; SERRANO-LÓPEZ, Juana ; ALONSO-DOMINGUEZ, Juan Manuel. Understanding the Notch Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: From Hematopoiesis to Neoplasia. **Cancers**, v. 14, n. 6, p. 1459, mar 2022.

LI, Jiexin; ZHANG, Haisheng ; WANG, Hongsheng. N1-methyladenosine modification in cancer biology: Current status and future perspectives. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 6578–6585, jan 2022.

LI, Kuangxun; *et al*. Pan-cancer analysis of N4-acetylcytidine adaptor THUMPD1 as a predictor for prognosis and immunotherapy. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 12, dez 2021.

LI, Mingying; *et al*. METTL3 mediates chemoresistance by enhancing AML homing and engraftment via ITGA4. **Leukemia**, v. 36, n. 11, p. 2586–2595, out 2022.

LI, Peng; DONG, Mingqiang; WANG, Zhigang. Downregulation of TSPAN13 by miR-369-3p inhibits cell proliferation in papillary thyroid cancer (PTC). **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 19, n. 2, ago 2018.

LI, Xiaoyu; *et al*. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 8, p. 592–597, ago 2015.

LI, Xiaoyu; XIONG, Xushen ; YI, Chengqi. Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 23–31, jan 2017.

LI, Yangchan; *et al*. TET2-mediated mRNA demethylation regulates leukemia stem cell homing and self-renewal. **Cell Stem Cell**, v. 30, n. 8, p. 1072-1090.e10, ago 2023.

LI, Zejuan; *et al*. FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N 6 -Methyladenosine RNA Demethylase. **Cancer Cell**, v. 31, n. 1, p. 127–141, jan 2017.

LIANG, Peiqi; *et al*. NAT10 upregulation indicates a poor prognosis in acute myeloid leukemia. **Current Problems in Cancer**, v. 44, n. 2, p. 100491, abr 2020.

LIAO, Xinai; *et al*. m ^{6} A RNA methylation regulators predict prognosis and indicate characteristics of tumour microenvironment infiltration in acute myeloid leukaemia. **Epigenetics**, v. 18, n. 1, dez 2022.

LINDER, Bastian; GROZHIK, Anya V; OLARERIN-GEORGE, Anthony O; *et al*. Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. **Nature Methods**, v. 12, n. 8, p. 767–772, jun 2015.

LINDSLEY, Coleman; Ebert, Benjamin. Review Series GENOME SEQUENCING AND ITS IMPACT ON HEMATOLOGY The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies. **Blood**, v. 122, n. 23, p. 3741-3748, nov 2013.

LIU, Jianheng; *et al*. Developmental mRNA m5C landscape and regulatory innovations of massive m5C modification of maternal mRNAs in animals. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, mai 2022.

LIU, Jianzhao; *et al*. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 93–5, 2014.

LIU, Nian ; PAN, Tao. RNA epigenetics. **Translational Research**, v. 165, n. 1, p. 28–35, jan 2015.

LIU, Nian; *et al*. N6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA–protein interactions. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 560–564, fev 2015.

LIU, Yuanyuan; *et al*. N4-acetylcytidine-dependent GLMP mRNA stabilization by NAT10 promotes head and neck squamous cell carcinoma metastasis and remodels tumor microenvironment through MAPK/ERK signaling pathway. **Cell death and disease**, v. 14, n. 11, nov 2023.

LIU, Ziying; *et al*. The roles of N6-methyladenosine and its target regulatory noncoding RNAs in tumors: classification, mechanisms, and potential therapeutic implications. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 55, n. 3, p. 487–501, mar 2023.

LUO, Hui; *et al*. ERCC6 plays a promoting role in the progression of non-small cell lung cancer. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 101, n. 3, p. 246–258, fev 2023.

LUO, Yuejun; *et al*. The potential role of N7-methylguanosine (m7G) in cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, mai 2022.

MA, Hai-Li; *et al*. SRSF2 plays an unexpected role as reader of m5C on mRNA, linking epitranscriptomics to cancer. **Molecular Cell**, v. 83, n. 23, p. 4239-4254.e10, dez 2023.

MALBEC, Lionel; *et al*. Dynamic methylome of internal mRNA N7-methylguanosine and its regulatory role in translation. **Cell Research**, v. 29, n. 11, p. 927–941, set 2019.

MAO, Yuanhui; *et al*. m 6 A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 5332, nov 2019.

MARGALIDA ROSSELLÓ-TORTELLA; FERRER, Gerardo ; MANEL ESTELLER. Epitranscriptomics in Hematopoiesis and Hematologic Malignancies. **Blood Cancer Discovery**, v. 1, n. 1, p. 26–31, jun 2020.

MASAKI, So; *et al*. Myelodysplastic Syndrome-Associated SRSF2 Mutations Cause Splicing Changes by Altering Binding Motif Sequences. **Frontiers in Genetics**, v. 10, abr 2019.

MEHMET TARDU; *et al*. Identification and Quantification of Modified Nucleosides in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 7, p. 1403–1409, jun 2019.

MERMOUD, Jacqueline E. The Role of the m6A RNA Methyltransferase METTL16 in Gene Expression and SAM Homeostasis. **Genes**, v. 13, n. 12, p. 2312, dez 2022.

MORAN-CRUSIO, Kelly; *et al*. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. **Cancer Cell**, v. 20, n. 1, p. 11–24, jul 2011.

NAREN, Duolan; *et al*. High Wilms' tumor 1 associating protein expression predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia and regulates m6A methylation of MYC mRNA. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 147, n. 1, p. 33–47, set 2020.

NEPSTAD, Ina; *et al*. The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2907, abr 2020.

NISHIKURA, Kazuko. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 83–96, dez 2015.

OAKES, Eimile; VADLAMANI, Pranathi; HUNDLEY, Heather. Methods for the Detection of Adenosine-to-Inosine Editing Events in Cellular RNA. In: YONGSHENG, SHI, Yongsheng. **mRNA Processing**: Methods and Protocols Volume 1648. 1ª ed. Humana Press, 2017. p. 103-127.

OSBORNE, Michael J. *et al*. Identification and Characterization of the Interaction Between the Methyl-7-Guanosine Cap Maturation Enzyme RNMT and the Cap-Binding Protein eIF4E. **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 5, p. 167451–167451, mar 2022.

PAN, Juan; *et al*. Roles and therapeutic implications of m6A modification in cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1132601, 2023.

PAN, Xin'an; *et al*. TET2 mutations contribute to adverse prognosis in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive analysis of 502 AML cases and the Beat AML public database. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 1, fev 2024.

PARAS, Gabrielle; *et al*. Effect of ECOG performance status on outcomes in patients with acute myeloid leukemia and other high-grade myeloid neoplasms. **Leukemia**, v. 37, n. 1, p. 231–234, jan 2023.

PARIS, Jasmin; *et al*. Targeting the RNA m6A Reader YTHDF2 Selectively Compromises Cancer Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. **Cell Stem Cell**, v. 25, n. 1, p. 137-148.e6, jul 2019.

PARK, Hee-Sue. What is new in acute myeloid leukemia classification? **Blood research**, v. 59, n. 1, abr 2024.

PASSEGUE, E.; *et al*. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. Supplement 1, p. 11842–11849, set 2003.

PAYER, Lindsay M; *et al*. Alu insertion variants alter mRNA splicing. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 421–431, jan 2019.

PERNER, Florian; *et al*. YBX1 mediates translation of oncogenic transcripts to control cell competition in AML. **Leukemia**, v. 36, n. 2, p. 426–437, ago 2021.

PING, Xiao-Li; *et al*. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. **Cell Research**, v. 24, n. 2, p. 177–189, jan 2014.

PINHO, Sandra ; FRENETTE, Paul S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 303–320, fev 2019.

QING, Yang; SU, Rui; CHEN, Jianjun. Review Series MOLECULAR MECHANISMS OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES RNA modifications in hematopoietic malignancies: a new research frontier. **Blood**, v. 138, n. 8, p. 637-648, ago 2021.

RIEGER, M. A. ; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, p. a008250–a008250, dez 2012.

ROBERTS, Justin; PORMAN, Allison; JOHNSON, Aaron. Identification of m 6 A residues at single-nucleotide resolution using eCLIP and an accessible custom analysis pipeline. **RNA**, v. 27, n. 4, p. 527-541, 2021.

ROSSETTI, C; *et al*. RNA editing signature during myeloid leukemia cell differentiation. **Leukemia**, v. 31, n. 12, p. 2824–2832, mai 2017.

SANG, Lina; *et al*. The m6A RNA methyltransferase METTL3/METTL14 promotes leukemogenesis through the mdm2/p53 pathway in acute myeloid leukemia. **Journal of Cancer**, v. 13, n. 3, p. 1019–1030, jan 2022.

SANZ, Miguel A. *et al*. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 133, n. 15, p. 1630–1643, fev 2019.

SASAKI, Koji *et al*. De novo acute myeloid leukemia: A population‐based study of outcome in the United States based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database, 1980 to 2017. **Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2049–2061, abr 2021.

SASAKI, Koji. et al. Prediction of survival with intensive chemotherapy in acute myeloid leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 97, n. 7, p. 865–876, abr 2022.

SEKI, Yoshinobu *et al*. Clinical Features of Disseminated Intravascular Coagulation According to the French-American-British Classification in Patients With Acute Leukemia and Thrombomodulin Alfa Treatment - A Cohort Study Using a Postmarketing Surveillance Database. **Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis**, v. 27, p. 107602962110540-107602962110540, nov 2021.

SHAFAT, Manar S; *et al*. The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts. **Blood Reviews**, v. 31, n. 5, p. 277–286, set 2017.

SHEN, Chao; *et al*. RNA Demethylase ALKBH5 Selectively Promotes Tumorigenesis and Cancer Stem Cell Self-Renewal in Acute Myeloid Leukemia. **Cell Press**, v. 27, n. 1, p. 64-80.e9, jul 2020.

SHEN, Qicong; *et al*. Tet2 promotes pathogen infection-induced myelopoiesis through mRNA oxidation. **Nature**, v. 554, n. 7690, p. 123–127, jan 2018.

SHI, Dong-Qiao; *et al*. New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function. **Frontiers in Genetics**, v. 8, jul 2017.

SHI, Hailing; WEI, Jiangbo; HE, Chuan, Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers, **Molecular Cell**, v. 74, n. 4, p. 640–650, mai 2019.

SHIMONY, Shai; STAHL, Maximilian ; STONE, Richard M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk‐stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 3, jan 2023.

SHLUSH, Liran I.; ZANDI, Sasan; MITCHELL, Amanda; et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 328–333, fev 2014.

SHORT, Nicholas J. ; RAVANDI, Farhad. Acute Myeloid Leukemia: Past, Present, and Prospects for the Future. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 16, p. S25–S29, ago 2016.

SLOTKIN, William; NISHIKURA, Kazuko. Adenosine-to-inosine RNA editing and human disease. **Genome Medicine**. v. 5, p. 105, 2013.

SONG, Bowen; *et al*. m7GHub: deciphering the location, regulation and pathogenesis of internal mRNA N7-methylguanosine (m7G) sites in human. **Bioinformatics**, v. 36, n. 11, p. 3528–3536, mar 2020.

SONG, Hang; *et al*. Biological roles of RNA m5C modification and its implications in Cancer immunotherapy. **Biomarker Research**, v. 10, n. 1, abr 2022.

SONG, Huijuan; *et al*. Splicing factor PRPF6 upregulates oncogenic androgen receptor signaling pathway in hepatocellular carcinoma. **Cancer Science**, v. 111, n. 10, p. 3665–3678, ago 2020.

SU, Rui; *et al*. METTL16 exerts an m6A-independent function to facilitate translation and tumorigenesis. **Nature Cell Biology**, v. 24, n. 2, p. 205–216, fev 2022.

SU, Wenjing; *et al*. ARAF protein kinase activates RAS by antagonizing its binding to RASGAP NF1. **Molecular Cell**, v. 82, n. 13, p. 2443-2457.e7, jul 2022.

SUNG, Hyuna; *et al*. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, fev 2021.

TALLMAN, Martin S. *et al*. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 17, n. 6, p. 721–749, jun 2019.

TEBBI, Cameron K. Etiology of Acute Leukemia: A Review. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2256, jan 2021.

THOMAS, Justin; *et al*. A Chemical Signature for Cytidine Acetylation in RNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 40, p. 12667–12670, set 2018.

TOMITA, Akihiro; KIYOI, Hitoshi ; NAOE, Tomoki. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As2O3) in acute promyelocytic leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 97, n. 6, p. 717–725, mai 2013.

TULSTRUP, Morten; *et al*. TET2 mutations are associated with hypermethylation at key regulatory enhancers in normal and malignant hematopoiesis. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6061, out 2021.

UMEDA, Shigeaki. et al. Prognostic significance of HOXB4 in *de novo* acute myeloid leukemia. **Hematology**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 125–131, mai 2012.

VARDIMAN, James W.; HARRIS, Nancy L. ; BRUNNING, Richard. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, n. 7, p.

2292–2302, jun 2002.VARSHNEY, Dhaval; *et al*. mRNA Cap Methyltransferase, RNMT-RAM, Promotes RNA Pol II-Dependent Transcription. **Cell Reports**, v. 23, n. 5, p. 1530–1542, mai 2018.

VU, Ly P. *et al*. The N6-methyladenosine (m6A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells. **Nature Medicine**, v. 23, n. 11, p. 1369–1376, nov 2017.

WALTER, Roland B. *et al*. Prediction of Early Death After Induction Therapy for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia With Pretreatment Risk Scores: A Novel Paradigm for Treatment Assignment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 33, p. 4417–4424, nov 2011.

WANG, Shanshan; *et al*. Dynamic regulation and functions of mRNA m6A modification. **Cancer Cell International**, v. 22, n. 1, jan 2022.

WANG, Xiao; *et al*. N6-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency, **Cell**, v. 161, n. 6, p. 1388–1399, jul 2015.

WANG, Ya‐Wen; *et al*. miR‐4732‐5p promotes breast cancer progression by targeting TSPAN13. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 4, p. 2549–2557, jan 2019.

WEN, Qiang; *et al*. m^5C regulator‐mediated methylation modification patterns and tumor microenvironment infiltration characteristics in acute myeloid leukemia. **Immunity Inflammation and Disease**, v. 12, n. 1, jan 2024.

WENG, Hengyou; *et al*. METTL14 Inhibits Hematopoietic Stem/Progenitor Differentiation and Promotes Leukemogenesis via mRNA m6A Modification. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 2, p. 191-205.e9, fev 2018.

WENG, Hengyou; *et al*. The m6A reader IGF2BP2 regulates glutamine metabolism and represents a therapeutic target in acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v. 40, n. 12, p. 1566-1582.e10, dez 2022.

WU, Shang-Ju; *et al*. The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3106–3111, out 2012.

XIAO, Wen; *et al*. Nuclear m 6 A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. **Molecular Cell**, v. 61, n. 4, p. 507–519, fev 2016.

XIAO, Han; *et al*. ADAR1 may be involved in the proliferation of acute myeloid leukemia cells via regulation of the Wnt pathway. **Cancer Management and Research**, v. Volume 11, p. 8547–8555, 2019.

XIE, Lihua; *et al*. Mechanisms of NAT10 as ac4C writer in diseases. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 32, p. 359–368, jun 2023.

XU, Lei; *et al*. RNA modifications act as regulators of cell death. **RNA Biology**, v. 18, n. 12, p. 2183–2193, jul 2021.

XU, Rui; WANG, Yue ; KUANG, Ye. Multi-omic analyses of m5C readers reveal their characteristics and immunotherapeutic proficiency. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, jan 2024.

XU, Yirong; *et al*. YTH Domain Proteins: A Family of m6A Readers in Cancer Progression. **Frontiers in Oncology**, v. 11, fev 2021.

YANG, Hui; *et al*. Preclinical activity of FF-10501-01, a novel inosine-5′-monophosphate dehydrogenase inhibitor, in acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 59, p. 85–92, ago 2017.

YANG, Xin; *et al*. 5-methylcytosine promotes mRNA export — NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m5C reader. **Cell Research**, v. 27, n. 5, p. 606–625, abr 2017.

YANG, Yuxi; OKADA, Shunpei ; SAKURAI, Masayuki. Adenosine-to-inosine RNA editing in neurological development and disease. **RNA Biology**, v. 18, n. 7, p. 999–1013, jan 2021.

YUE, Yanan; *et al*. VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3′UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. **Cell Discovery**, v. 4, n. 1, fev 2018.

ZAGO, Marco A. *et al*. **Tratado de Hematologia**. 1ª Edição. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Editora Atheneu, 2014.

ZENG, Chengwu; *et al*. Roles of METTL3 in cancer: mechanisms and therapeutic targeting. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, ago 2020.

ZHANG, Bing; LI, Dong; WANG, Ran. Transcriptome Profiling of N7-Methylguanosine Modification of Messenger RNA in Drug-Resistant Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 12, jul 2022.

ZHANG, Hao; *et al*. NAT10 regulates neutrophil pyroptosis in sepsis via acetylating ULK1 RNA and activating STING pathway. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1–13, set 2022.

ZHANG, Li-Sheng; *et al*. Transcriptome-wide Mapping of Internal N7-Methylguanosine Methylome in Mammalian mRNA. **Molecular Cell**, v. 74, n. 6, p. 1304-1316.e8, jun 2019.

ZHANG, Minying; *et al*. RNA editing derived epitopes function as cancer antigens to elicit immune responses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, set 2018.

ZHANG, Na; *et al*. The m6A reader IGF2BP3 promotes acute myeloid leukemia progression by enhancing RCC2 stability. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 54, n. 2, p. 194–205, fev 2022.

ZHANG, Shujun; *et al*. Recent advances in the potential role of RNA N4-acetylcytidine in cancer progression. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, jan 2024.

ZHANG, Xin; *et al*. Biological roles of RNA m7G modification and its implications in cancer. **Biology Direct**, v. 18, n. 1, set 2023.

ZHANG, Zhi-Wei; *et al*. The role of m6A demethylase FTO in chemotherapy resistance mediating acute myeloid leukemia relapse. **Cell Death Discovery**, v. 9, n. 1, jul 2023.

ZHAO, Wanqing; *et al*. PACES: prediction of N4-acetylcytidine (ac4C) modification sites in mRNA. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, jul 2019.

ZHAO, Yanchun; *et al*. m6A-binding proteins: the emerging crucial performers in epigenetics. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, p. 35, abr 2020.

ZHAO, Zhicong; *et al*. QKI shuttles internal m7G-modified transcripts into stress granules and modulates mRNA metabolism. **Cell**, v. 186, n. 15, p. 3208-3226.e27, jul 2023.

ZHOU, Guang-Biao; *et al*. Retinoic Acid and Arsenic for Treating Acute Promyelocytic Leukemia. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 1, p. e12, jan 2005.

ZHU, Tingting; *et al*. Crystal structure of the YTH domain of YTHDF2 reveals mechanism for recognition of N6-methyladenosine. **Cell Research**, v. 24, n. 12, p. 1493–1496, mar 2014.

ZI, Jie; HAN, Qi; *et al*. Targeting NAT10 Induces Apoptosis Associated With Enhancing Endoplasmic Reticulum Stress in Acute Myeloid Leukemia Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 10, dez 2020.