



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

LÍLIAN CASSEMIRO FEITOSA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA E IMPACTO PROGNÓSTICO DO
POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDIO ÚNICO rs16754 DO GENE *WT1*
EM PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Recife
2022

LÍLIAN CASSEMIRO FEITOSA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA E IMPACTO PROGNÓSTICO DO
POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDIO ÚNICO rs16754 DO GENE *WT1*
EM PACIENTES ADULTOS COM 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: Prof. Dr. Antônio Roberto
Lucena de Araújo

Recife
2022

LÍLIAN CASSEMIRO FEITOSA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA E IMPACTO PROGNÓSTICO DO
POLIMORFISMO *WT1* SNP rs16754 EM PACIENTES ADULTOS COM
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: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Dedico este trabalho a...

À minha mãe, que sempre fez e faz de tudo por mim sem medir esforços, e mesmo que ela diga que tudo que eu conquistei foram frutos do meu trabalho duro, eu sempre retribuirei dizendo que sem ela na minha vida nada do que tenho hoje seria possível. Ao meu namorado/marido, que esteve e está ao meu lado nos melhores e piores momentos, que está sempre me impulsionando e me fazendo acreditar que sou capaz de qualquer coisa que eu quiser. E também a minha amiga Patrícia, que mesmo distante está sempre presente, me motivando, ouvindo meus surtos e me dando conselhos. E a todos que me ajudaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo por acreditar em mim e me confiar esta pesquisa, por todo o conhecimento que me foi passado e pela paciência.

Agradeço também a minha co-orientadora Aleide Santos de Lima Melo, por me ajudar a melhorar a minha escrita acadêmica, por refinar bastante os meus conhecimentos e pela paciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra por ter me aceitado como aluna estagiária do setor de hematologia do LabCen muito antes de pagar a disciplina de exames hematológicos, pois isto foi muito importante para que eu me apaixonasse ainda mais pela hematologia. E também a todo conhecimento que me foi passado até agora.

Agradeço ao LabCen pela infraestrutura e por todos os equipamentos e materiais que foram essenciais para o desenvolvimento da minha pesquisa. E também a toda equipe do LabCen, que sempre foram atenciosos e dispostos a ajudar.

Agradeço à FACEPE por acreditar no meu projeto e por financiá-lo, pois esse apoio foi imprescindível para a realização da pesquisa

Agradeço a minha mãe por acreditar em mim e por me dar todo o amor e suporte que eu precisava para chegar onde cheguei, pois sem ela não sei o que seria de mim. Agradeço ao meu namorado/marido por ser um parceiro maravilhoso e por não medir esforços para me ajudar no que pode. Agradeço a minha amiga Patrícia por ser mais que uma amiga, por ser uma irmã e ficar feliz por mim quando acontecem coisas boas e por chorar comigo nos dias ruins.

"A sabedoria é uma paradoxo. O homem que
mais sabe é aquele que mais reconhece a
vastidão da sua ignorância"
(Friedrich Nietzsche)

FEITOSA, Lílian Cassemiro. **Avaliação da frequência e impacto prognóstico do polimorfismo de nucleotídeo único rs16754 do gene WT1 em pacientes adultos com leucemia mieloide aguda**. 2022. 58 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

O WT1, fator de transcrição altamente expresso em cerca de 90% das leucemias mieloides agudas (LMA), apresenta funções antagônicas, atuando ora como oncogene, ora como supressor tumoral, dependendo do ambiente celular. Mutações adquiridas no gene que codifica esta proteína têm sido descritas em aproximadamente 10% dos pacientes com LMA, entretanto o impacto dessas mutações no desfecho desses pacientes permanece controverso. Destaque tem sido dado ao polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphism*, SNP) sinônimo rs16754 (903A>G), por ter demonstrado efeito favorável no desfecho clínico dos pacientes. Mesmo sendo conhecidos como SNPs sinônimos, esses polimorfismos podem alterar o fenótipo através das alterações da estrutura e estabilidade do RNAm, do splicing alternativo e das mudanças na cinética de tradução. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência do SNP rs16754 em voluntários saudáveis e pacientes adultos com LMA *de novo* excluindo leucemia promielocítica aguda, por apresentar uma forma de tratamento diferente do esquema quimioterápico padrão (protocolo “3+7”), e avaliar o seu impacto no desfecho clínico. Foram incluídos no estudo 195 pacientes adultos com LMA *de novo* e 197 controles saudáveis (sem história prévia de doença hematológica ou oncológica). A genotipagem foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Para as análises de desfecho clínico foram incluídos 93 pacientes com LMA, tratados com o esquema quimioterápico padrão (protocolo “3+7”). A distribuição alélica entre os grupos estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg. Ao todo, 113 pacientes (58%) apresentaram o genótipo selvagem WT1 AA, enquanto que 72 (37%) e 10 (5%) pacientes apresentaram o genótipo AG e GG, respectivamente. O cenário correspondente para indivíduos saudáveis foi: 141 indivíduos (72%) com o genótipo WT1 AA, 47 indivíduos (24%) com o genótipo WT1 AG e 9 indivíduos (4%) com o genótipo WT1 GG. O alelo G esteve associado com um risco aumentado para a LMA (OR=1,564; IC95%: 1,098-2,227; $p=0,016$), assim como os genótipos AG+GG em relação ao genótipo AA (OR=1,833; IC95%: 1,205-2,788; $p=0,006$). Ao restringir nossas análises aos 93 pacientes com LMA, variáveis clínicas e laboratoriais foram comparadas utilizando-se o modelo de herança dominante (ou seja, genótipo AA *versus* AG+GG). Não houve diferenças significativas entre os grupos. A mediana de seguimento foi de 270 dias (IC95%: 134-406) e a sobrevida global (SG) estimada em cinco anos foi de 15,9%. Houve uma tendência para uma maior SG estimada em cinco anos do grupo com ao menos um alelo mutante (AG+GG) em relação ao grupo sem o alelo mutante (AA) (18,7% e 14,8%, respectivamente), entretanto, a diferença não foi significativa ($p=0,65$). Os genótipos mutados também não apresentaram impacto na sobrevida livre de doença ($p=0,92$) e na taxa de remissão completa ($p=0,08$). Em resumo, nós demonstramos

que o polimorfismo WT1 rs16754 foi associado com um maior risco para o desenvolvimento da LMA, embora sem impacto no desfecho clínico dos pacientes.

Palavras-chave: Leucemia mieloide aguda. Prognóstico. Polimorfismo. SNP. WT1.

FEITOSA, LÍLIAN CASSEMIRO. **Evaluation of the frequency and prognostic impact of the single nucleotide polymorphism rs16754 of the WT1 gene in adult patients with acute myeloid leukemia.** 2022. 58 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

WT1, a transcription factor highly expressed in about 90% of acute myeloid leukemias (AML), has antagonistic functions, acting either as an oncogene or as a tumor suppressor, depending on the cellular environment. Acquired mutations in the gene encoding this protein have been described in approximately 10% of patients with AML, however the impact of these mutations on the outcome of these patients remains controversial. Highlight has been given to single nucleotide polymorphism (SNP) synonym rs16754 (903A>G), for having demonstrated a favorable effect to the clinical outcome of patients. Even though they are known as synonymous SNPs, these polymorphisms can alter the phenotype through changes in mRNA structure and stability, alternative splicing, and changes in translation kinetics. Therefore, the objective of this work was to assess the frequency of the rs16754 SNP in healthy volunteers and patients adults with *de novo* AML excluding acute promyelocytic leukemia, for presenting a form of treatment different from the standard chemotherapy regimen (protocol “3+7”), and assess their impact on clinical outcome. 195 adult patients with *de novo* AML and 197 healthy controls (no previous history of hematologic or oncologic disease) were included in the study. Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction. For the clinical outcome analyses, 93 AML patients treated with the standard chemotherapy regimen (protocol “3+7”) were included. The allelic distribution between the groups were in Hardy-Weinberg equilibrium. Altogether, 113 patients (58%) had the wild-type WT1 AA genotype, while 72 (37%) and 10 (5%) patients had the AG and GG genotype, respectively. The corresponding scenario for healthy subjects was: 141 subjects (72%) with the WT1 AA genotype, 47 subjects (24%) with the WT1 AG genotype, and 9 subjects (4%) with the WT1 GG genotype. The G allele was associated with an increased risk for AML (OR=1.564; 95%CI: 1.098-2.227; p=0.016), as were the AG+GG genotypes in relation to the AA genotype (OR=1.833; 95%CI: 1.205 -2.788; p=0.006). By restricting our analyzes to 93 AML patients, clinical and laboratory variables were compared using the dominant inheritance model (ie, AA genotype versus AG+GG). There were no significant differences between the groups. The median follow-up was 270 days (95%CI: 134-406) and the estimated five-year overall survival (OS) was 15.9%. There was a trend towards a higher estimated SG at five years in the group with at least one mutant allele (AG+GG) in relation to the group without the mutant allele (AA) (18.7% and 14.8%, respectively), however , the difference was not significant (p=0.65). The mutated genotypes also had no impact on disease-free survival (p=0.92) and complete remission rate (p=0.08). In summary, we demonstrated that the WT1 rs16754 polymorphism was associated with an increased

risk for the development of AML, although with no impact on the clinical outcome of patients.

Key words: Acute myeloid leukemia. Prognosis. Polymorfism. SNP. *WT1*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do processo de hematopoese normal	14
Figura 2 - Estimativa para o ano de 2020 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária	17
Figura 3 - Esquema do <i>two hit model</i>	19
Figura 4 - Blasto com bastonete de auer	21
Figura 5 - Estrutura do gene e da proteína WT1	26
Figura 6 - Pareamento das idades do grupo caso com o grupo controle	39
Figura 7 - Probabilidade da sobrevida global dos 148 pacientes com LMA de novo que realizaram o tratamento "3+7" comparando a coorte de Recife com a de Ribeirão Preto	39
Figura 8A - Probabilidade da sobrevida global dos 148 pacientes com LMA de novo que realizaram o tratamento "3+7"	39
Figura 9A - Probabilidade da sobrevida global (SG) de 148 pacientes com LMA de novo que realizaram o tratamento 3+7 e que tiveram seus genótipos comparados pelo modelo dominante	40
Figura 8B - Probabilidade da sobrevida livre de doença dos 92 pacientes com LMA de novo que alcançaram a remissão completa.	41
Figura 9B - Probabilidade da sobrevida livre de doença (SLD) de 92 pacientes com LMA de novo que alcançaram a remissão completa e que tiveram seus genótipos comparados pelo modelo dominante	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação OMS (2016) para a LMA e neoplasias relacionadas	23
Tabela 2 Distribuição das frequências de sexo e idade entre os casos e os controles	34
Tabela 3 - Distribuição das frequências dos alelos e genótipos do SNP rs16754 do gene <i>WT1</i>	35
Tabela 4 - Caracterização dos 148 pacientes com LMA de novo submetidos ao tratamento "3+7"	38
Tabela 5 - Taxa de remissão completa entre os genótipos AA versus AG+GG dos 148 pacientes incluídos nas análises de desfecho clínico.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTH	Célula tronco hematopoética
LMA	Leucemia mieloide aguda
SMD	Síndrome mielodisplásica
EUA	Estados Unidos da América
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMC	Leucemia mieloide crônica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
IL	Interleucina
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulomonocíticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LMA-CN	Leucemia mieloide aguda com cariótipo normal
FAB	Franco-Americano-Britânico
OMS	Organização mundial da saúde
TRM	Resistência ou mortalidade associada ao tratamento
WBC	Contagem de leucócitos
ATRA	Ácido trans-retinóico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
CEP	Comitê de Ética de Pernambuco
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
CTH	Célula tronco hematopoética
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
CNS	Conselho Nacional de Saúde
LPA	Leucemia promielocítica aguda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
RC	Remissão completa
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
DN	Distribuição normal
g/m ²	Gramas por metro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	HEMATOPOESE	14
2.2	LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	15
2.3	FISIOPATOGENIA DA LMA	17
2.4	DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA LMA	20
2.5	FATORES PROGNÓSTICO NA LMA	24
2.6	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GENE <i>WT1</i>	26
2.7	GENE <i>WT1</i> NA LMA	27
2.8	SNP <i>WT1</i> RS16754	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	METODOLOGIA	30
4.1	CASUÍSTICA E TRATAMENTO	31
4.2	ANÁLISES MOLECULARES	32
4.3	DESFECHO	32
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	ESTUDO DE CASO E CONTROLE	33
5.2	ASSOCIAÇÃO DO <i>WT1</i> SNP RS16754 COM VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS E DESFECHO CLÍNICO DOS PACIENTES COM LMA.....	36
6	CONCLUSÃO	42

REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	51
ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco	51
ANEXO B - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética da Fundação Hemope.....	52
ANEXO C - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética do Hospital do Câncer de Pernambuco.....	53
ANEXO D - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP	54

1 INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide aguda (LMA) constitui um heterogêneo grupo de doenças clonais das células progenitoras hematopoiéticas, as quais são incapazes de se diferenciarem terminalmente e de responderem a estímulos regulatórios da proliferação e morte celular. Conseqüentemente, estas células progenitoras anormais tendem a se acumular na medula óssea, podendo ainda escapar para o sangue periférico e infiltrar outros órgãos e tecidos (Estey, 2013).

Devido à sua heterogeneidade biológica e de resposta ao tratamento, a estratificação de risco para a avaliação prognóstica de pacientes com LMA é a principal ferramenta para prever a evolução clínica e assim determinar o protocolo terapêutico mais adequado a cada paciente. Atualmente, anormalidades citogenéticas ao diagnóstico constituem o principal fator prognóstico independente da LMA. Contudo, cerca de 50-55% dos pacientes são citogeneticamente normais (LMA-CN). Esses pacientes apresentam uma significativa heterogeneidade clínica e o uso de marcadores moleculares pode ser usado como estratégia para estratificações subjacentes (Grossmann et al., 2012). Entre esses marcadores moleculares, os que apresentam seu significado prognóstico bem estabelecido são as mutações no gene *NPM1* associado às mutações *FLT3/ITD*, as mutações bialélicas no gene *CEBPA* e as mutações nos genes *RUNX1*, *ASXL1* e *TP53*. Entretanto, existem outros marcadores, como por exemplo, as mutações nos genes *IDH1/2*, *DNMT3A* e *WT1*, que ainda apresentam um efeito prognóstico obscuro nos pacientes com LMA, merecendo maiores estudos para elucidar seus efeitos no desfecho desses pacientes, bem como, seu papel na leucemogênese mielóide (Döhner et al., 2017).

O gene *WT1*, que recebe esse nome devido seu papel no tumor de Wilms, está localizado no cromossomo 11 e codifica um fator de transcrição com um domínio N-terminal (exons 1 a 6) e um domínio C-terminal contendo quatro domínios de dedo-de-zinco (exons 7 a 10) (A. Renneville et al., 2011). Estudos funcionais do *WT1* revelaram papéis contraditórios, como um gene supressor tumoral em alguns estudos e como um oncogene em outros. A proteína funciona como um potente fator de transcrição para genes envolvidos com crescimento celular e metabolismo. Embora seu papel na hematopoese ainda não esteja claro, suspeita-se que a

disfunção do *WT1* seja responsável por promover a proliferação celular e por dificultar a diferenciação celular (Yang et al., 2007).

O gene *WT1* é um marcador estável do clone leucêmico, estando altamente expresso (em 70 a 90%) nos pacientes com LMA e, dessa forma, tem se mostrado uma ferramenta útil para o monitoramento da doença residual mínima (Frairia et al., 2017). Entretanto, o impacto prognóstico dos níveis de expressão do *WT1* ao diagnóstico ainda permanece incerto (Ho et al., 2011; Petiti et al., 2018a). Mutações adquiridas no gene *WT1* (principalmente nos exon7 e 9) têm sido descritas em aproximadamente 10% dos pacientes com LMA, mas o papel dessas mutações no desfecho desses pacientes ainda permanece controverso (Damm et al., 2010; Luna et al., 2012; Aline Renneville et al., 2009). Destaque tem sido dado ao SNP (do inglês, *single-nucleotide polymorphism*) sinônimo rs16754, por seu efeito favorável no desfecho dos pacientes com LMA. Esse polimorfismo está localizado no exon7 do gene *WT1* e consiste em uma troca de uma adenina por uma guanina no códon 903 (CGA>CGG), não alterando o aminoácido arginina na sequência da proteína (A. Renneville et al., 2011).

SNPs sinônimos têm sido frequentemente chamados de silenciosos, mas novas evidências indicam que eles podem ter um papel importante na alteração de fenótipo. Diversos mecanismos como alterações da estrutura e estabilidade do RNAm, alterações nos sítios de ligação de micro-RNA, splicing alternativo e mudanças na cinética de tradução têm sido propostos para explicar como os SNPs sinônimos podem alterar a estrutura ou a atividade da proteína (Sauna et al., 2007). Nesse contexto, é proposto que o códon CGG, resultado do SNP *WT1* rs16754, é usado duas vezes mais frequentemente do que o códon selvagem CGA para codificar a arginina, podendo alterar a cinética da tradução (A. Renneville et al., 2011).

Estudos recentes têm demonstrado que o SNP *WT1* rs16754 parece predizer um desfecho clínico favorável para os pacientes adultos com LMA citogeneticamente normais (LMA-CN) (Damm et al., 2010; Ho et al., 2011; Petiti et al., 2018b). Entretanto os resultados ainda são bastante controversos (Chen et al., 2012; Luna et al., 2012; A. Renneville et al., 2011), sendo necessários maiores estudos para elucidar o papel desse polimorfismo no desfecho dos pacientes com LMA, bem como, seu papel na leucemogênese. Diante disso, temos como objetivo

avaliar a frequência do SNP *WT1* rs16754 em voluntários saudáveis e em pacientes com LMA *de novo* e avaliar seu impacto no desfecho desses pacientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

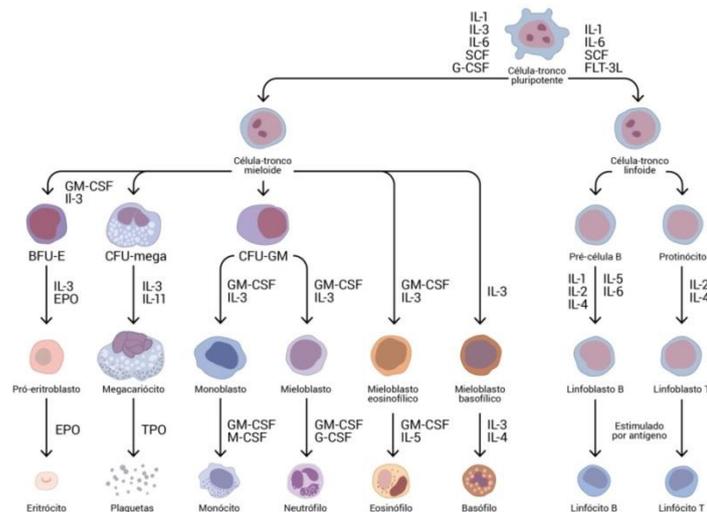
2.1 HEMATOPOESE

A hematopoese é o processo de formação do sangue, ela ocorre no interior da medula óssea que é o órgão responsável pela produção das células sanguíneas. Este processo de produção do sangue ocorre de forma hierarquizada, no qual uma célula imatura, indiferenciada e não funcional dará origem a uma célula madura, diferenciada e funcional que irá para o sangue periférico exercer sua função (figura 1). As células-tronco hematopoéticas (CTH), se encontram no topo dessa hierarquia, elas passam por múltiplas divisões e por vários estágios de diferenciação para originarem as duas linhagens hematopoéticas: a linhagem mieloide, que compreende os eritrócitos, as plaquetas, os neutrófilos, os eosinófilos, os basófilos e os monócitos; e a linhagem linfóide, que compreende os linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK (Olson et al., 2020).

A maturação das linhagens celulares distintas na medula óssea em grande parte depende da interação local com componentes microambientais medulares, que compreendem células reticulares, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos, bem como adipócitos e osteoblastos. A hematopoiese é influenciada por um grande número de produtos solúveis secretados pelas células presentes neste microambiente, incluindo citocinas típicas, fatores de crescimento e quimiocinas, compreendendo entre outros, interleucina (IL)-1, IL-3, fator estimuladores de colônias granulocíticas (G-CSF) e fator estimulador de colônias granulocítica/monocítica (GM-CSF). Além disso, o hormônio eritropoietina, normalmente produzido no rim, é crucial para o desenvolvimento da linhagem eritróide, enquanto que a trombopoietina é importante para a produção dos megacariócitos e, finalmente, para a diferenciação plaquetária (Zia et al., 2017).

Figura 1 - Fluxograma do processo de hematopoese normal.

Legenda: Este esquema demonstra a sequência maturativa das células sanguíneas e também as citocinas, interleucinas, hormônios e fatores de crescimento que ajudam a orientar o processo de produção dessas células a depender das necessidades do organismo.



Fonte: Adaptado de Seldin e Sloan (2015)

Para que os tipos específicos de células sanguíneas sejam produzidos em quantidades satisfatórias para regenerar a hematopoese de forma contínua, as CTHs sofrem um processo extremamente fino de regulação para definir se elas devem permanecer em quiescência ou proliferar, se devem sofrer auto-renovação ou escolher alguma linhagem e se diferenciar em algum tipo celular, ou ainda se devem permanecer vivas ou entrar em apoptose. Quando esses processos ocorrem respeitando as necessidades do organismo, sejam elas necessidades estacionárias ou em situações de lesão, a hematopoese ocorre normalmente. Entretanto, se ocorrer alguma alteração nessa fina regulação haverá o aparecimento de doenças hematológicas como as leucemias (RIEGER; SCHROEDER, 2012).

2.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A leucemia mieloide aguda (LMA) constitui um grupo heterogêneo de doenças clonais das células progenitoras hematopoéticas. Essas células

progenitoras, também chamadas de blastos, sofreram alterações genéticas e se tornaram incapazes de se diferenciarem terminalmente e de responderem a estímulos regulatórios da proliferação e morte celular. Conseqüentemente, estas células progenitoras anormais tendem a se acumular na medula óssea, podendo ainda escapar para o sangue periférico e infiltrar outros órgãos e tecidos como o baço, fígado e pele, podendo infiltrar até mesmo o cérebro e os pulmões quando a contagem dos blastos no sangue periférico estiver superior a 50.000/ μ L (Estey, 2018; Jacamo et al., 2017).

Na maioria dos casos de LMA a etiologia é desconhecida, mas existem alguns fatores de risco que estão relacionadas a esta doença como: idade avançada, sexo masculino, tabagismo, exposição a produtos químicos (benzeno e formaldeído), neoplasias mieloproliferativas crônicas (policitemia vera, mielofibrose idiopática, trombocitemia essencial), síndrome mielodisplásica (SMD), drogas quimioterápicas (agentes alquilantes, inibidores da topoisomerase II), exposição a altas doses de radiação, síndromes genéticas (como a anemia de Fanconi, síndrome de Bloom) e histórico familiar de LMA (Narayanan & Weinberg, 2020).

A leucemia mieloide aguda é a segunda leucemia mais comum em adultos, em contraste, apenas 20% dos casos relatados ocorrem na infância, tendo assim uma baixa frequência em crianças. (Deschler & Lübbert, 2006; Puumala et al., 2013). Entre os adultos nos Estados Unidos da América (EUA), a incidência da LMA foi superior ao dos outros três subtipos de leucemia (leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crônica (LMC) e leucemia linfocítica crônica (LLC)) até 2017 (Shallis et al., 2019).

Antes do ano de 2010 a incidência de LMA ajustada por idade nos EUA foi de 3,43 casos de LMA para cada 100.000 habitantes por ano. Entretanto, esta incidência tem aumentado ao longo do tempo, pois do ano de 2010 em diante ela se encontra consistentemente superior a 4,2 casos de LMA para cada 100.000 habitantes por ano (Shallis et al., 2019).

Sendo assim a LMA é a leucemia mais prevalente em adultos e é uma doença relativamente rara. Entretanto é importante o estudo desta doença por possuir um curso rápido e alta mortalidade, pois 70% dos pacientes diagnosticados com LMA vão a óbito por causa dessa doença. A atual taxa de sobrevida global em crianças é de apenas 60-70% e depois cai progressivamente com idade para < 5%

naqueles com idade superior a 65 anos. Tanto as crianças quanto os adultos morrem dentro de 5 anos após o diagnóstico devido a uma combinação de recaída, e mortalidade relacionada ao tratamento (até 35% e 99%, respectivamente) (Aung et al., 2021).

No Brasil, a incidência da LMA é desconhecida, pois o Instituto Nacional do Câncer (INCA) apresenta apenas dados referêntes às leucemias em geral. Para o ano de 2020, o INCA relatou a ocorrência de 10.810 novos casos, sendo 5.920 homens e 4.890 mulheres (INCA, 2020) (figura 2). Em um estudo realizado no Hospital de Hematologia de Pernambuco (HEMOPE), em 2011, a LMA correspondeu a 41% de todos os casos de leucemias diagnosticados no período de 1997 a 2007 (Carvalho et al., 2011).

Figura 2 - Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada									
Próstata	65.840	62,95	50,78	13.640	60,53	57,33	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	66.280	61,61	43,74	19.820	78,88	45,90
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.710	16,35	15,38	3.780	14,98	12,26
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	16,99	16,19	3.180	14,17	16,11	12.440	11,56	9,24	3.760	14,96	11,32
Cólon e Reto	20.540	19,64	18,80	5.320	23,59	21,26	20.470	19,03	13,36	6.260	24,90	15,59
Estômago	13.360	12,81	11,37	2.430	10,85	11,23	7.870	7,34	5,95	1.920	7,71	6,61
Cavidade Oral	11.200	10,70	9,25	2.040	9,03	9,19	4.010	3,71	2,66	970	3,73	3,21
Laringe	6.470	6,20	5,75	1.150	5,00	4,97	1.180	1,06	0,92	360	1,06	0,79
Bexiga	7.590	7,23	4,61	1.800	7,87	7,12	3.050	2,80	2,03	900	3,44	2,61
Esôfago	8.690	8,32	6,48	1.160	5,00	6,27	2.700	2,49	1,76	460	1,60	1,42
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.650	6,18	4,84	1.870	7,50	5,19
Linfoma de Hodgkin	1.590	1,52	1,33	450	1,71	1,93	1.050	0,95	0,88	430	1,35	1,04
Linfoma não Hodgkin	6.580	6,31	5,67	1.430	6,41	7,27	5.450	5,07	3,37	1.260	4,96	4,27
Glândula Tireoide	2.310	2,17	1,52	1.090	4,52	1,81	11.950	11,15	8,13	4.650	18,47	8,13
Sistema Nervoso Central	5.870	5,61	5,22	1.150	5,07	6,27	5.230	4,87	4,17	1.280	5,03	4,55
Leucemias	5.920	5,67	5,55	1.210	5,43	5,93	4.890	4,56	3,95	1.180	4,69	4,64
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.540	6,07	5,22	1.930	7,61	6,14
Pele Melanoma	4.200	4,03	2,01	790	3,36	3,40	4.250	3,94	1,78	870	3,28	2,49
Outras Localizações	48.060	45,97	41,48	9.320	41,34	48,09	42.390	39,43	29,40	9.790	38,88	26,48

INCA, 2020.

2.3 FISIOPATOGENIA DA LMA

Na grande maioria dos indivíduos diagnosticados com LMA, não é possível identificar nenhum fator de risco predisponente. No entanto, o risco de desenvolver LMA é moderadamente aumentado pela exposição a agentes que danificam o DNA, como como benzeno, fumaça de cigarro, radiação ionizante (geralmente devido à radioterapia terapêutica) e quimioterapia citotóxica (agentes alquilantes e inibidores da topoisomerase) (Khwaja et al., 2016). Outros fatores que podem predispor o desenvolvimento da LMA são: a idade do paciente, presença de doenças hematológicas antecedentes, presença de desordens genéticas, a exposições a alguns tipos de vírus e exposições relacionadas a riscos ocupacionais. No entanto, na maioria dos casos, a LMA aparece como uma malignidade *de novo* em indivíduos previamente saudáveis (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016; Deschler & Lübbert, 2006).

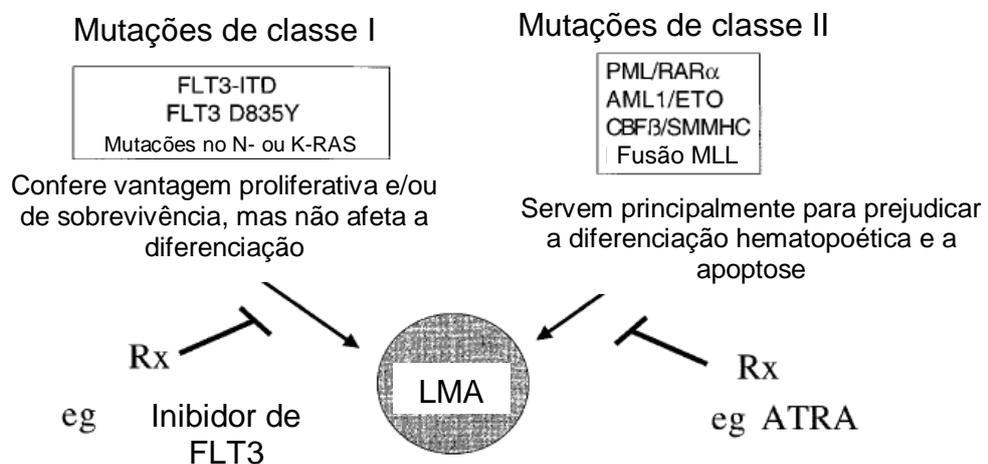
A patogênese da LMA é caracterizada pela aquisição seriada de mutações somáticas e vários genes estão recorrentemente mutados nesta doença. No entanto, não se sabe quando tais mutações aparecerão antes do desenvolvimento da doença evidente, nem como elas evoluem e também não se sabe quais os riscos específicos associados a cada uma dessas mutações (Desai et al., 2018).

Já foram descritas mais de 300 translocações e/ou inversões cromossômicas que estão associadas na fisiopatologia dessa doença. Essas translocações cromossômicas podem envolver grandes ganhos ou perdas de material genético (Deolinda et al., 2011; Dinardo & Cortes, n.d.).

Os alvos mais frequentes das translocações cromossômicas na leucemia mieloide aguda são os genes que codificam fatores de transcrição, que são proteínas muito importantes para a regulação da proliferação, diferenciação e morte celular dos progenitores hematopoéticos. Sendo assim, os rearranjos estruturais provenientes das translocações, produzem uma nova proteína híbrida com funções aberrantes (oncoproteínas), que afetam expressão gênica das células tronco hematopoéticas ou progenitoras, de maneira que subvertem a programação normal de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, causando a substituição de precursores mieloides normais por células malignas, indiferenciadas e sem função, responsáveis por originar a deficiência hematopoiética (isto é, granulocitopenia, trombocitopenia e/ou anemia) na medula óssea e no sangue periférico (Kavianpour et al., 2016; Look, 1997).

Mesmo sendo bastante complexo definir a causa exata do estabelecimento da LMA, existe um estudo que propôs um modelo que explica como o processo leucemogênico se estabelece, esse modelo é conhecido como "two hit model", na qual existem duas classes de mutações: as mutações de classe I (que compreende as mutações no gene *FLT3*, *c-KIT* e *RAS*), que confere uma vantagem proliferativa ou de sobrevivência para as células; e uma segunda classe de mutações que são as mutações de classe II (que compreende a translocação t(8;21) que gera o gene híbrido chamado *AML1/ETO*, a translocação t(15;17) gerando o *PML/RARA* e a inversão do cromossomo 16 que produz o gene de fusão chamado de *CBFB/MYH11*) que serve principalmente para interferir/bloquear a diferenciação das células progenitoras hematopoiética e para contribuir com a autorrenovação do clone leucêmico (figura3). Dessa forma, este modelo afirma que o estabelecimento da leucemia mieloide aguda ocorrerá se houver mutações acumuladas em diferentes genes (Gilliland & Griffin, 2015).

Figura 3 - Esquema do "Two Hit Model"



Fonte: (Gilliland & Griffin, 2015).

Entretanto, existem alterações no microambiente da medula óssea que podem contribuir para o desenvolvimento da LMA. Isso ocorre pela presença de mutações em genes que controlam a apoptose dos blastos, levando ao aumento da produção de proteínas anti-apoptóticas responsáveis pela inibição da apoptose dos precursores hematopoéticos na medula óssea (Bernasconi, 2008).

Além disso, a regulação epigenética não altera o código genético, mas é capaz de modular a transcrição e a expressão gênica. Sendo assim, é evidente que os padrões de metilação desempenham um papel importante na alteração da expressão de genes cruciais para a leucemogênese. E como as mutações na epigenética não estão inseridas nas duas classes do *two hit model*, significa que o processo de leucemogênese é mais complicado do que a presença de apenas dois tipos de mutações para levar ao surgimento da LMA (Brien et al., 2014).

Existem também algumas alterações genéticas como as nos genes *NPM1*, *IDH1*, *IDH2* e entre outros, que foram recentemente descobertas e que não são capazes de serem identificadas pela citogenética (diferente das translocações t(8;21) e t(15;17) por exemplo), os indivíduos que são diagnosticados com LMA e que possuem estas mutações são chamados de pacientes com leucemia mieloide aguda com cariótipo normal (LMA-CN). Essas mutações também não pertencem a nenhuma das duas classes do modelo "*Two Hit*" e por isso são chamadas de "mutações não classificadas" (Takahashi, 2011).

Dessa forma, a fisiopatogenia da LMA ainda possui muitas lacunas a serem preenchidas para que seja possível a total compreensão dos processos que levam ao estabelecimento da LMA. Por isso, é bastante necessário estudar esses processos e ampliar assim o modelo "two hit".

2.4 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA LMA

Geralmente, o diagnóstico de LMA inicia-se a partir de uma suspeita clínica que ocorre quando o paciente apresenta sinais e sintomas resultantes de infiltração leucêmica da medula óssea. As manifestações clínicas mais frequentes dessa doença incluem: hemorragia, que ocorre pela diminuição da produção das plaquetas; anemia e palidez, resultante da diminuição dos eritrócitos; assim como febre e infecções, por causa da neutropenia. Isso acontece devido a substituição de células hematopoéticas normais da medula óssea por células leucêmicas, impedindo a produção das células normais (De Lima et al., 2016; Rubnitz et al., 2010).

Para confirmar a suspeita da LMA é necessário primeiramente fazer um hemograma, pois na grande maioria dos casos ocorre uma leucocitose pela

presença dos blastos no sangue periférico, e que a depender do subtipo da LMA podem ser observados os bastonetes de Auer no interior do citoplasma dos blastos (figura 4), que são marcadores específicos de leucemia mieloide aguda. Os bastonetes de Auer são produzidos pela fusão de grânulos azurofílicos e contêm proteínas neutras juntamente com várias enzimas. Além da leucocitose pode ocorrer também a diminuição do número de eritrócitos circulantes (eritropenia) e diminuição também das plaquetas (trombocitopenia). (Hassan & Rees, 1990, INCA).

Figura 4 - Blasto com bastonete de Auer



Fonte: Adaptado de Medical Labs, 2014

Após o hemograma, é necessária a realização do mielograma, que corresponde a aspiração de uma quantidade de medula óssea para a realização de vários outros testes para fechar o diagnóstico da LMA. Com o sangue proveniente da medula óssea, primeiramente é necessário fazer o estudo morfológico, que inclui a observação da morfologia e da quantidade de blastos na medula óssea (>20%). Além da observação das características morfológicas dos blastos, é possível também a realização da coloração citoquímica, que apesar dos progressos da imunofenotipagem, as reações citoquímicas ainda são úteis no diagnóstico das LMAs, pois elas auxiliam na identificação da origem mieloide/monocítica dos blastos. Embora a morfologia continue sendo o fundamento para o diagnóstico, técnicas adicionais, incluindo imunofenotipagem, avaliação citogenética e estudos de genética molecular, tornaram-se essenciais e, em alguns casos específicos, são

ferramentas complementares obrigatórias (Da Silva et al., 2006; Haferlach & Schmidts, 2020, INCA).

Em 1976 o Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) desenvolveu um sistema de classificação da leucemia mieloide aguda que levou em consideração apenas as características morfológicas e citoquímicas convencionais. Esta classificação é baseada no reconhecimento do tipo da linhagem acometida pelo clone leucêmico e pelo seu grau de maturação. Inicialmente, esta classificação separou as leucemias mieloide agudas em 6 subtipos diferentes: LMA M1, M2 e M3 (linhagem granulocítica), LMA M4 (granulo-monocítica), LMA M5a e M5b (monocítica) e LMA M6 (eritróide). Mais tarde, entre os anos de 1985 a 1991 esta classificação foi atualizada, pois além das características morfológicas e citoquímicas dos blastos, esta classificação incluiu a imunofenotipagem como método de diagnóstico, e com isso foram adicionados mais dois subtipos: a LMA M7 (megacariocítica) e a LMA M0 (minimamente diferenciada), pois apenas observando a morfologia e a citoquímica não era possível distinguir estes dois últimos subtipos (BENNETT, 1985; Bennett et al., 1976, 1991; K. Hassan et al., 1993; Walter et al., 2013).

Entretanto, a classificação FAB tornou-se progressivamente obsoleta por não incorporar os achados citogenéticos e moleculares relevantes à fisiopatogenia da doença. Dessa forma a classificação FAB forneceu uma terminologia comum e útil, porém limitada em significado biológico, prognóstico e terapêutico (Benício & Rego, 2013)

Sendo assim em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma nova classificação da LMA incorporando os achados genéticos (citogenéticos e moleculares) e introduziu importantes correlações prognósticas. Nesta classificação, a LMA foi dividida em 4 subgrupos: LMA com anormalidades citogenéticas recorrentes, LMA com displasia de múltiplas linhagens, LMA relacionada ao tratamento e LMA não categorizável. Em 2008 a classificação da OMS foi atualizada, ampliando o número de entidades com translocações cromossômicas recorrentes e incluiu duas entidades provisórias caracterizadas por mutações genéticas, LMA com mutação no *NPM1* e LMA com mutações *CEBPA* (Heerema-McKenney & Arber, 2009; Vardiman et al., 2002).

Mais tarde, em 2016 houve uma nova atualização na classificação da OMS, sendo adicionadas mais duas novas entidades provisórias: LMA com *BCR-*

ABL1, capaz de guiar a terapia dos pacientes com um inibidor de tirosina quinase; e LMA com mutação no *RUNX1*, que está possivelmente relacionado a um pior prognóstico (Arber, 2019).

Tabela1: Classificação OMS (2016) para a LMA e neoplasias relacionadas. Adaptado de Arber et al. (2016)

Leucemia mieloide aguda e neoplasias relacionadas

LMA com alterações genéticas recorrentes

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

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

LPA com *PML-RARA*

LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*

LMA com t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*

LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*

LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*

Entidade temporária: LMA com *BCR-ABL1*

LMA com NMP1 mutado

LMA com mutações bialélicas de *CEBPA*

Entidade temporária: LMA com *RUNX1* mutado

LMA com mudanças relacionadas a mielodisplasia

Neoplasias mieloides relacionadas com a terapia

LMA não categorizada nos itens anteriores

LMA com diferenciação mínima

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia mielomonocítica aguda

Leucemia monoblástica/monocítica aguda

Leucemia eritroide pura

Leucemia megacarioblástica aguda

Leucemia basofílica aguda

Pan-mielose aguda com mielofibrose

Sarcoma

Proliferações mielóides relacionadas à síndrome de Down

Mielopoese anormal transiente

Leucemia mielóide associada com síndrome de Down

2.5 FATORES PROGNÓSTICO NA LMA

A avaliação precisa do prognóstico é fundamental para o manejo da LMA, pois é necessário estratificar os pacientes de acordo com o risco de resistência ao tratamento ou mortalidade relacionada ao tratamento (TRM). Dessa forma os fatores prognósticos auxiliam na orientação da escolha entre o tratamento padrão ou aumento da intensidade desse tratamento, ajudam também a prever se o paciente se beneficiará mais da quimioterapia de consolidação ou do transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016).

Os fatores prognósticos podem ser subdivididos em dois grupos: o primeiro que compreende aos fatores relacionados às características do paciente e ao seu estado geral de saúde; e o segundo grupo corresponde aos fatores relacionados com as características particulares do clone leucêmico. Os fatores do primeiro grupo estão mais associados a mortalidade relacionada ao tratamento (TRM) e torna-se mais importante à medida que a idade do paciente aumenta, enquanto que os fatores do segundo prediz resistência a terapia convencional (Döhner et al., 2010).

Entre os fatores relacionados ao paciente a idade avançada é um dos fatores de risco mais fortes para um desfecho ruim na LMA. Isso ocorre devido ao fato dos pacientes idosos com LMA geralmente possuírem outras comorbidades e por terem status de desempenho reduzido. Além disso, esses pacientes podem possuir aberrações citogenéticas mais frequentes e muitas vezes a LMA é secundária a síndromes mielodisplásicas (SMD) ou a neoplasias mieloproliferativas (NMP) (Hecker et al., 2018; Liesveld, 2012).

Embora existam muitos fatores com significado prognóstico bem estabelecido na LMA, aqueles que são considerados mais importantes, além da idade, inclui a contagem de leucócitos (WBC), pois os pacientes com o WBC acima de 100.000 possuem um quadro chamado de hiperleucocitose que prediz um pior

prognóstico, pois esses pacientes cursam com uma menor taxa de remissão completa e de sobrevida livre de doença e uma maior taxa de mortalidade. Além da idade e do WBC, os outros fatores prognósticos importantes são o status de desempenho, a função do órgão/comorbidades, o tipo de LMA (*de novo* vs. secundária), o cariótipo e a presença de mutações moleculares (Ganzel & Rowe, 2011; Liesveld, 2012).

De acordo com a classificação atual da OMS, é necessária busca de defeitos genéticos em pacientes com LMA, pois a depender do tipo do defeito é possível não só identificar o subtipo da LMA, auxiliando no diagnóstico, mas é possível também que essas alterações citogenéticas sejam utilizadas como ferramentas para a estratificação de risco (Prada-Arismendy et al., 2017).

Cerca de 45% das leucemias agudas têm um cariótipo com alguma alteração cromossômica recorrente, e cerca de 15% têm 3 ou mais anormalidades citogenéticas (cariótipo complexo). Mesmo com o avanço das pesquisas e busca por marcadores moleculares de prognóstico, os estudos citogenéticos permanecem como indicador prognóstico extremamente importante, pois é possível classificar o prognóstico dos pacientes com LMA de acordo com as alterações cromossômicas em três grupos: o grupo de risco favorável que inclui a leucemia promielocítica aguda com $t(15;17)$ e é o único subtipo de LMA que é associado a uma terapia específica (ácido trans-retinóico (ATRA)). Leucemias mieloides agudas com $t(8;21)$ ou $inv(16)/t(16;16)$ também tendem a estar na categoria de risco favorável, mas são tratados com os mesmos agentes que todos os outros subtipos (citarabina, doxirrubicina). O grupo de risco adverso inclui $t(6;9)$, $inv(3)/t(3;3)$ e cariótipo complexo. Casos com múltiplas alterações tendem a ser observados em pacientes mais velhos e têm um prognóstico extremamente ruim. Casos com alteração citogenética que não pertencem ao grupo de prognóstico favorável, bem como os casos sem alterações citogenéticas (LMA-CN) estão incluídos no grupo de prognóstico intermediário. O risco geral no grupo de LMA-CN é intermediário, no entanto, o resultado em casos individuais varia consideravelmente e está relacionado em parte à presença ou ausência de anormalidades moleculares específicas (Betz & Hess, 2010; Marchesi et al., 2011; Mrózek et al., 2001).

Cerca de 40% dos casos de LMA têm cariótipo normal e pertencem ao grupo de prognóstico intermediário. Esses pacientes apresentam uma significativa heterogeneidade clínica e o uso de marcadores moleculares pode ser empregado

como estratégia para estratificações subjacentes. O significado prognóstico para este grupo (LMA-CN) têm sido consistentemente demonstrado para mutações nos genes *NPM1*, *CEBPA* e *FLT3* sozinhos ou em combinação em pacientes adultos mais jovens (Döhner et al., 2010; Ganzel & Rowe, 2011; Grossmann et al., 2012).

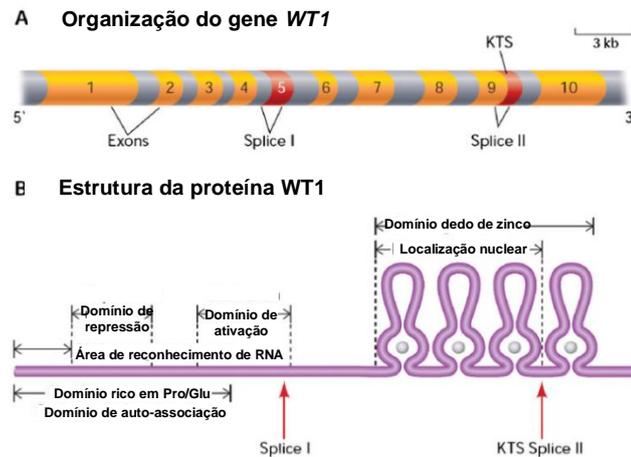
Pacientes com LMA-CN abrigando duplicação in tandem interna (ITD) do gene *FLT3* possui um prognóstico inferior em comparação com os casos sem *FLT3-ITD*. Aproximadamente 40% de pacientes com mutações *NPM1* também carregam *FLT3-ITD*, e múltiplos estudos mostraram que o genótipo com mutação no *NPM1* e ausência de mutação no gene *FLT3-ITD* representa um marcador prognóstico favorável. Pacientes com LMA-CN com mutações no *CEBPA* constitui um outro subconjunto que têm sido associado com prognóstico favorável. Os dados de sobrevida são muito semelhantes aos dos pacientes com LMA com *NPM1* mutado sem *FLT3-ITD*. Entretanto, permanece o questionamento se a presença de mutação no *FLT3-ITD* impacta no prognóstico em pacientes com *CEBPA* mutante (Döhner et al., 2010).

Existem outros marcadores, como por exemplo, as mutações nos genes *IDH1/2*, *DNMT3A* e *WT1*, que ainda apresentam um efeito prognóstico obscuro nos pacientes com LMA, merecendo maiores estudos para elucidar seus efeitos no desfecho desses pacientes, bem como, seu papel na leucemogênese mieloide (Döhner et al., 2017).

2.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GENE *WT1*

O gene *WT1*, que recebe esse nome devido seu papel no tumor de Wilms, está localizado no cromossomo 11p13 e codifica um fator de transcrição com um domínio N-terminal (exons 1 a 6) e um domínio C-terminal contendo quatro domínios de dedo-de-zinco (exons 7 a 10) (figura 5) (A. Renneville et al., 2011; Stefanidis & Querfeld, 2011).

Figura 5 – Estrutura do gene e da proteína WT1



Fonte: adaptado de Stefanidis & Querfeld (2011)

Estudos funcionais do *WT1* revelaram papéis contraditórios, como um gene supressor tumoral em alguns estudos e como um oncogene em outros. A proteína funciona como um potente fator de transcrição para genes envolvidos com o crescimento celular e metabolismo. Embora seu papel na hematopoese normal ainda não esteja claro, a disfunção do *WT1* é considerada para promover proliferação celular e dificultar a diferenciação celular (Yang et al., 2007).

O gene *WT1* interage com uma variedade de outras proteínas. Entre elas estão a p53, que o *WT1* estabiliza e desempenha um papel na prevenção da apoptose. O *WT1* também se liga à proteína de choque térmico 90 e STAT3, resultando em um aumento da proliferação de células tumorais de Wilms. Mais recentemente, foi demonstrado que o gene *WT1* interage com a epigenética modificadores *TET2* e *TET3* em leucemias mieloides agudas (Rampal & Figueroa, 2016).

2.7 GENE *WT1* NA LMA

O gene *WT1* se encontra superexpresso nas leucemias mieloides e nas linfoides da mesma forma. A superexpressão têm sido descrita nas crises blásticas mieloides e linfoides da LMC (mas não na fase crônica da LMC), e na síndrome mielodisplásica (SMD). No entanto, apesar de ambas as malignidades

hematológicas abrigarem a super expressão do *WT1*, este fenômeno têm sido mais estudado na LMA. O *WT1* se encontra superexpresso na maioria dos pacientes com LMA. Na SMD, a superexpressão está associada com maior contagem de blastos e um risco aumentado de progressão para a LMA. Vários estudos demonstraram que estes níveis aumentados de *WT1* na LMA estão associados à resistência à terapia, à uma maior incidência de recidiva e à uma menor sobrevida global (Rampal & Figueroa, 2016).

Em um estudo, os blastos de 139 pacientes com LMA com menos de 60 anos tratados com quimioterapia típica foram avaliados para os níveis de transcrição de *WT1*. A probabilidade de três anos de sobrevida global foi de 59% em pacientes com baixa expressão de *WT1* e 21% em pacientes com níveis elevados de *WT1* ($p=0,046$) (Yang et al., 2007). No entanto, esses estudos contrastaram com as observações feitas por Schmid e colaboradores onde em 125 pacientes com LMA de novo, os níveis de RNA do *WT1* não se correlacionaram com a sobrevida livre de doença e remissão clínica. Essa discrepância pode ter ocorrido devido às diferenças de metodologias da medição de *WT1*, diferenças na população de pacientes tratados ou ainda na intensidade dos esquemas utilizados (Schmid et al., 1997; Yang et al., 2007).

Algumas mutações somáticas recorrentes no gene *WT1* ocorrem em aproximadamente 5-15% dos pacientes com LMA de novo e podem estar associadas a pacientes mais jovens, a presença de mutações no *FLT3-ITD* e no *CEBPA*. Em uma análise multivariada envolvendo 470 pacientes com LMA de novo (excluindo a leucemia promielocítica aguda) foi demonstrado que as mutações no gene *WT1* estavam associadas à piora na sobrevida global e na sobrevida livre de doença (Rampal & Figueroa, 2016).

Diversas mutações no gene *WT1* foram descritas na LMA, essas mutações ocorrem primariamente nos éxons 1, 7 e 9. Estas mutações incluem substituições, deleções e inserções de base. A grande maioria dessas mutações resulta na criação de códons de parada e mudanças na matriz de leitura, resultando na perda de função e expressão de uma proteína truncada sem o domínio de dedo de zinco, acarretando a perda da capacidade de ligação ao DNA ou até a perda completa da expressão da proteína *WT1*. Mutações no *TET2* e *IDH1/2* são ambas exclusivas da LMA e este mutante *TET2/IDH* na LMA é caracterizada por um fenótipo comum de hipermetilação de DNA. *TET2* é um membro da família de

proteínas *TET* que catalizam a conversão de 5-metilcitosina (5-mC) a 5-hidrometilcitosina (5-hmC). Mutações no *WT1* são fortemente correlacionadas com as mutações no *TET2* e *IDH1/2*, levando a hipótese de que as mutações no *WT1* também podem corresponder a um subgrupo de LMAs caracterizadas por baixos níveis de 5-hmC, e além disso, que o *WT1* pode ter um papel nesta via epigenética (Rampal & Figueroa, 2016).

2.8 SNP *WT1*RS16754

A sequência de DNA nuclear é aproximadamente 99,5% idêntica entre dois seres humanos não aparentados (NUSSBAUM, 2016). Em determinadas localizações do cromossomo (loci) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, essas variações são denominadas de polimorfismos (Rocha, 2007). A forma mais simples de polimorfismo entre os indivíduos é a substituição de um único nucleotídeo por outro. Esse tipo de mudança é chamado de "polimorfismo de nucleotídeo único" (SNP) e é mais comum do que outros tipos de polimorfismos. Essas mudanças simples são consideradas estáveis e não deletérias. De acordo com um relatório publicado, 50% dos SNPs ocorrem nas regiões não codificantes, 25% levam a mutações missense, e os 25% restantes são mutações silenciosas. Esses SNPs silenciosos também são chamados de "SNPs sinônimos" porque eles não alteram a aminoácidos codificados (Shastry, 2009).

Novas evidências indicam que os SNPs sinônimos podem ter um papel importante na alteração de fenótipo. Diversos mecanismos como alterações da estrutura e estabilidade do RNAm, alterações nos sítios de ligação de micro-RNA, splicing alternativo e mudanças na cinética de tradução têm sido propostos para explicar como os SNPs sinônimos podem alterar a estrutura ou a atividade da proteína (Sauna et al., 2007).

O SNP *WT1* rs16754 está localizado no exon 7 do gene *WT1* e consiste em uma mudança de nucleotídeo adenina (A) em guanina (G). A presença dos genótipos variantes *WT1* GG e *WT1* AG têm uma incidência entre 26 e 36% em pacientes caucasianos. Um estudo recente de Petit e colaboradores enfatizou a

possibilidade de impacto significativo no desfecho de pacientes com LMA que possuem o SNP *WT1* rs16754 (Petiti et al., 2018).

O SNP *WT1* rs 16754 é considerado para ser um possível SNP regulador e está associado ao desbalanço alélico na expressão gênica, sendo o alelo variante G superexpresso em comparação com o alelo selvagem A. Adicionalmente o códon variante CGG, resultado do SNP *WT1* rs16754, é usado duas vezes mais frequentemente do que o códon selvagem CGA para codificar a arginina (explicar isso melhor!). (A. Renneville et al., 2011). De acordo com o site Ensembl de genômica comparativa, o polimorfismo rs16754 do gene *WT1* possui uma frequência de 33% na população mundial, 12% na população Africana, 32% na população Americana, de 70% no leste da Ásia e de 41% no sul deste continente, e de 17% na população Européia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do polimorfismo de nucleotídeo único rs16754 do gene *WT1* no desfecho clínico de pacientes com leucemia mieloide aguda, bem como o seu envolvimento no risco para a LMA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência do polimorfismo *WT1* rs16754 em voluntários saudáveis e em pacientes com LMA de novo excluindo a leucemia promielocítica aguda (LPA).
2. Determinar o significado prognóstico do polimorfismo *WT1* rs16754 para os pacientes com LMA *de novo* excluindo a LPA, utilizando algumas medidas como a sobrevida global (SG), sobrevida livre de doença (SLD), taxa de remissão completa e taxa de recaída como desfecho.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA E TRATAMENTO

Este estudo de caso e controle foi submetido aos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Nº do parecer: 2.412.470) Anexo A (Parecer 1), da Fundação HEMOPE/PE (Nº do parecer: 2.644.746) Anexo B (Parecer 2), do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) (Nº do parecer: 2.656.851) Anexo C (Parecer 3) e do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) (Nº do parecer: 3.195.996) Anexo D (Parecer 4). As coletas de amostra e de dados de prontuário iniciaram-se após a aprovação do projeto pelo comitê de ética dos respectivos hospitais e foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Foram incluídas neste estudo amostras consecutivas de pacientes adultos com LMA *de novo*, excluindo pacientes com leucemia promielocítica aguda (LPA), diagnosticados de março de 2010 a junho de 2017 e acompanhados no HEMOPE, no HCP e no IMIP, seguindo os critérios de classificação/diagnóstico preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Outra coorte de pacientes LMA, não LPA, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto também foi incluída. Foram incluídos nesse estudo 195 pacientes com LMA *de novo* da população de Recife/PE e 42 pacientes de Ribeirão Preto/SP, constituindo um total de 237 pacientes. O material de escolha dos pacientes com LMA foram amostras de medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP). Foi utilizado somente o material excedente àquele utilizado ao diagnóstico, com autorização prévia dos participantes após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os pacientes foram maiores de 18 anos e submetidos ao esquema de tratamento 3+7, como descrito anteriormente (Melchionda et al., 2013) (Lima et al. 2015). Foram incluídas, também, amostras de SP, de 197 voluntários saudáveis do Hospital das Clínicas (sem histórico de doença hematológica ou oncológica), de ambos os sexos e com idade entre 18 e 90 anos. Foi utilizado apenas o material excedente àquele utilizado para exames de rotina no Laboratório do Hospital das Clínicas, com autorização prévia dos participantes após

leitura e consentimento do TCLE.

4.2 ANÁLISES MOLECULARES

As análises moleculares foram realizadas no setor de Hematologia do LabCen/CB/UFPE. A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos totais de pacientes com LMA *de novo* e de voluntários saudáveis, seguindo a técnica de fenol-clorofórmio modificado (Davis et al. 1986). A genotipagem foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real por discriminação alélica utilizando o sistema TaqMan® que consiste em sondas marcadas com fluoróchromos desenhadas especificamente para serem complementares à cadeia de oligonucleotídeos. Os *primers* e sondas que foram utilizados para pesquisa do *WT1* SNP rs16754 estão disponíveis para o uso de caráter científico no site (<https://products.appliedbiosystems.com> – ID: C__12034416_10). As reações de qPCR foram realizadas no aparelho Rotor Gene 6000TM (CorbettResearch, Austrália). Além das associações prévias com a LMA, foi utilizado como critério de seleção para o polimorfismo *WT1* rs16754 o MAF (do inglês, minor allele frequency) superior a 10% em populações contribuintes para a miscigenação da população brasileira (Africana:12% e Europeia: 17%) Disponível no site(https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=11:32395899-32396899;v=rs16754;vdb=variation;vf=164442142).

4.3 DESFECHO

O seguimento dos pacientes foi censurado/atualizado em dezembro de 2018. Os pacientes em que o seguimento foi perdido foram censurados na última data em que sabidamente estavam vivos. Os pacientes foram submetidos ao esquema quimioterápico “3+7” que consiste em: 1. Indução de remissão: um ou dois ciclos de daunorrubicina 60mg/m²/dia por três dias (D1 a D3), associado de Ara-C 100 ou 150 mg/m²/dia em infusão contínua por 7 dias (D1 a D7) e 2. Consolidação e

intensificação: dois ou três ciclos de altas doses de Ara-C 3g/m²/dia. A mortalidade precoce foi definida como morte nos primeiros 30 dias após o diagnóstico. A remissão completa (RC) foi definida como aspirados de medula óssea normocelulares, contendo menos de 5% de blastos leucêmicos e com evidências de maturação normal dos outros elementos, bem como a não visualização de blastos leucêmicos circulantes ou evidência de leucemia extramedular. Recaída foi definida como a presença de 5% ou mais de blastos na medula óssea, presença de blastos leucêmicos circulantes no sangue periférico, ou o desenvolvimento de leucemia extramedular. Sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) foram calculadas usando o método Kaplan-Meier. SG refere-se ao tempo compreendido entre o diagnóstico e o óbito/censura. SLD é o tempo entre a remissão completa e a recaída ou óbito/censura.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS Statistics 19.0 e GraphPad Prism5a. As variáveis contínuas, inicialmente, foram submetidas ao teste de Kolmogorov-smirnov (KS), a fim de analisar se a variável apresentava distribuição normal (DN). Para as variáveis que apresentaram DN, a comparação entre os grupos propostos foi realizada utilizando o teste T não pareado. Para as variáveis que não apresentavam DN, a comparação entre os grupos propostos foi realizada utilizando o teste Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos utilizando o teste Chi-quadrado ou o teste exato de Fisher. As probabilidades estimadas, a média e a mediana para curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank, utilizado para comparar as diferenças entre as curvas. Valores de *P* menores ou iguais a 5% foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS DE CASO E CONTROLE

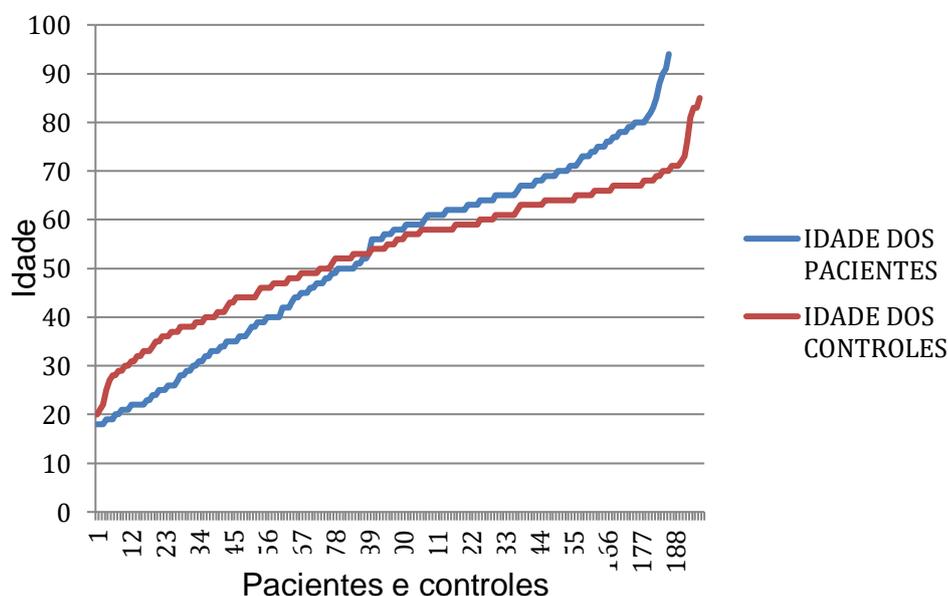
No estudo de associação do polimorfismo *WT1* rs16754 ao risco para a LMA, o grupo caso foi constituído de 195 pacientes com LMA *de novo*, dos quais 105 foram do sexo feminino e 90 do sexo masculino, com uma mediana de idade de 45 anos. O grupo controle foi constituído de 197 indivíduos sem histórico de doença hematológica ou oncológica, os quais 106 foram do sexo feminino e 91 do sexo masculino e com uma mediana de idade de 58 anos. O grupo controle foi pareado por idade e sexo com o grupo caso (Figura 6). Entretanto houve uma dificuldade amostral no pareamento do grupo caso com o controle com relação à idade, (Tabela 2) (sexo $p=1,00$; idade $p=0,91$). Neste estudo de caso e controle não foi incluída a coorte de Ribeirão Preto, pois os controles foram constituídos apenas pela população de Recife.

Tabela2: Distribuição das frequências de sexo e idade entre os casos e os controles

	Controle n= 197 (Freq)	Caso n=195 (Freq)	P-Value
Sexo	-	-	1,00 ^{*A}
Mulheres	106 (53,8%)	105 (53,8%)	-
Homens	91 (46,2%)	90 (46,2%)	-
Idade,Mediana (intervalo)	56 (20-85)	45 (18-90)	0,91 ^{*B}
Dados perdidos (idade)	1	9	-

*A: Teste exato de Fisher, *B: Teste de Kruskal-Walis.

Figura 6: Pareamento das idades do grupo caso com o grupo controle



A Tabela 3 mostra as frequências alélicas do alelo selvagem A e do alelo variante G e as frequências genóticas, utilizando o modelo codominante AA x AG x GG e o modelo dominante AA x AG+GG, dos controles e dos pacientes com LMA. O modelo que melhor representou nossos resultados foi o modelo dominante. Foi observado que houve uma maior frequência do alelo variante (G) no grupo caso (24%) em relação ao controle (16%) (OR=1,56; $p=0,016$).

Houve também uma maior frequência do genótipo com ao menos um alelo variante (AG+GG) no grupo caso (42%) em relação ao controle (28%) (OR=1,83; $p=0,006$). Dessa forma, é provável que haja um risco aumentado para a LMA na presença do alelo variante. Entretanto, o que pode ter dificultado a observação do risco aumentado utilizando o modelo codominante foi o baixo número de pacientes e controles que possuíam o genótipo GG, sendo assim, é possível que exista também um risco aumentado para a LMA utilizando o modelo codominante, mas que não fomos capazes de identificar por causa da baixa frequência do genótipo variante homocigoto GG.

Tabela 3: Distribuição das frequências dos alelos e genótipos do SNP rs16754 do gene *WT1*

	Controle	Paciente	LMA OR (IC 95%)	P-Value
Alelo	n= 394	n=390 (Freq)	-	-
A	329 (0,84)	298 (0,76)	Referência	-
G	65 (0,16)	92 (0,24)	1,56 (1,1-2,23)	0,016 *A
Genótipo	n=197	n=195 (Freq)	-	-
Codominante				
AA	141 (0,72)	113 (0,58)	Referência	-
AG	47 (0,24)	72 (0,37)	1,91 (1,23-2,98)	0,005 *B
GG	9 (0,04)	10 (0,05)	1,39 (0,54-3,53)	0,634 *B
Dominante				
AA	141 (0,72)	113 (0,58)	Referência	-
AG+GG	56 (0,28)	82 (0,42)	1,83 (1,2-2,79)	0,006 *C

*A: Teste exato de Fisher, *B: Teste Qui-quadrado, *C: Teste exato de Fisher.

O produto do gene *WT1* desempenha vários e importantes papéis na biologia celular, como proliferação, diferenciação, apoptose e desenvolvimento de

tecidos (Yu et al., 2020). O *WT1* SNP rs16754 é considerado como um SNP regulador está associado ao desequilíbrio alélico na expressão gênica, sendo o alelo variante superexpresso em comparação com o alelo selvagem (A. Renneville et al., 2011).

A expressão do *WT1* é detectada na maioria dos pacientes com LMA. Foi hipotetizado que esta alta expressão de *WT1* originou-se de uma alta população de células leucêmicas; no entanto, não foi confirmada uma correlação direta entre a porcentagem de blastos ou positividade de CD34 e a expressão de *WT1*. A alta expressão de *WT1* não pode ter se originado apenas do grande número de blastos leucêmicos na amostra, pois a porcentagem de blastos ao diagnóstico varia de 20% a 100%. Assim, os pesquisadores especularam que os níveis de expressão de *WT1* refletiriam as diferenças biológicas na LMA em cada paciente (Hidaka et al., 2018).

Um estudo de Chen e colaboradores avaliaram o SNP *WT1* rs16754 em crianças chinesas com LMA demonstrou que não houve um risco aumentado para a LMA, pois não houve diferença significativa nas frequências genotípicas entre os controles e casos. Além disso, Damm e colaboradores também demonstraram que as frequências genotípicas dos casos e dos controles adultos foram similares, não havendo um risco aumentado para a LMA. Entretanto, um estudo de Phoenix A. Ho demonstrou que há diferenças significantes nas frequências genotípicas dependendo da origem étnica da população estudada. Sendo assim, a discordância entre o nosso estudo e estes outros pode ter ocorrido devido à variação genética entre as populações estudadas (Chen et al., 2012; Damm et al., 2010; Ho et al., 2011).

5.2 ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS16754 DO GENE *WT1* COM VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS E DESFECHO CLÍNICO DOS PACIENTES COM LMA

Para as análises de sobrevida foram incluídos 148 pacientes, sendo 106 da coorte Recife e 42 da coorte de Ribeirão Preto. Em ambas as coortes os pacientes foram submetidos ao esquema quimioterápico “3+7” (Lima et al, 2015). Os 106 pacientes foram caracterizados de acordo com a idade, o sexo, os subtipos da FAB, as anormalidades citogenéticas, a estratificação de risco citogenético segundo os critérios do *Medical Research Council* (Grimwade et al., 2010), as mutações nos

genes *FLT3* e *NPM1*, o risco molecular, a contagem de blastos na medula óssea, a contagem de leucócitos e plaquetas e dosagem de hemoglobina no sangue periférico. Dos 42 pacientes de Ribeirão Preto, todos foram incluídos nas análises de sobrevida e foram caracterizados de acordo com a idade, o sexo, os subtipos da FAB, as anormalidades citogenéticas, a estratificação de risco citogenético segundo os critérios do *Medical Research Council* (Grimwade et al., 2010), as mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* e o risco molecular. Não estavam disponíveis os dados de contagem de leucócitos e plaquetas e a dosagem de hemoglobina destes 42 pacientes. A análise citogenética foi realizada em 103 pacientes, entretanto em 15 pacientes não foram obtidas metáfases satisfatórias para as análises. Dos 88 pacientes com resultado satisfatório da análise citogenética, 40 (39%) apresentaram cariótipo normal, condizendo com a frequência em torno de 40% entre as LMA *de novo* relatadas na literatura (Tabela 3) (Döhner et al., 2017; Grimwade et al., 2010).

Em relação ao polimorfismo SNP rs16754 do gene *WT1* e sua associação com os dados clínicos e laboratoriais, escolhemos o modelo dominante para as análises, pois foi o que melhor representou nossos resultados. Foi observado que não houve associação do polimorfismo com nenhuma das variáveis clínico e laboratoriais analisadas (Tabela 4), o que está de acordo com os achados da literatura (Chen et al., 2012; Damm et al., 2010; Petiti et al., 2018b; Toogeh et al., 2016).

Entretanto, o estudo de Phoenix A. Ho e colaboradores demonstrou que não houve diferenças significativas para sexo, idade, mediana da contagem de blastos no diagnóstico, mediana da contagem de leucócitos no diagnóstico ou subtipo FAB entre pacientes SNP-positivos e SNP-negativos (Ho et al., 2011). Contudo, este estudo encontrou diferenças significativas na distribuição racial desse polimorfismo, pois o *WT1* SNP rs16754 ocorreu com a maior frequência em pacientes de ascendência asiática (66%) e hispânica (42%) e foi menos frequente em pacientes brancos (24%) e afro-americanos (22%) (Ho et al., 2011). Um outro estudo de Petiti e colaboradores encontrou uma tendência de uma maior frequência de mutação no *FLT3* em pacientes com o genótipo contendo pelo menos uma alelo mutado (AG+GG) (Petiti et al., 2018a).

Tabela 4: Caracterização dos 148 pacientes com LMA *de novo* submetidos ao tratamento "3+7"

	WT1 SNP rs16754 (modelo dominante)								P ¹
	Todos		AA		AG+GG				
	N	%	N	%	N	%			
Idade, média (intervalo)	43(18-70)		42 (18-70)		43 (18-70)				0,14
Sexo									0,53
Mulheres	72	48,6	47	31,7	25	16,9			
Homens	76	51,4	49	33,1	27	18,2			
Subtipos da FAB									0,85
M0	9	6,8	4	3,0	5	3,8			
M1	21	16,0	14	10,6	7	5,3			
M2	46	34,8	31	23,5	15	11,4			
M4	44	33,3	28	21,2	16	12,1			
M5	7	5,3	5	3,8	2	1,5			
M6	5	3,8	3	2,3	2	1,5			
Anormalidades Citogenéticas									0,33
Cariótipo normal	40	39,0	26	25,2	14	13,5			
t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1	12	11,6	7	6,7	5	4,8			
inv(16)(p13;q22)t(16;16)(p13;q22)/CBFB/MYH11	6	5,8	4	3,9	2	2,0			
Trissomia 8	3	3,0	0	0,0	3	3,0			
Cariótipo complexo	12	11,6	9	8,8	3	3,0			
Anormalidades 11q23	2	2,0	2	2,0	0	0,0			
¹ Sem metáfase	15	14,5	11	10,6	4	3,9			
Outros	13	12,6	9	8,8	4	3,8			
² Estratificação de risco citogenético									0,53
Favorável	18	20,5	11	12,5	7	8,0			
Intermediário	53	60,2	33	37,5	20	22,7			
Desfavorável	17	19,3	13	14,8	4	4,5			
FLT3-ITD									0,36
Mutado	29	20,2	20	14,0	9	6,3			
Não mutado	114	79,8	72	50,3	42	29,4			
Mutações no NPM1									0,27
Mutado	37	25,0	26	17,5	11	7,4			
Não mutado	111	75,0	70	47,2	41	28,0			
³ Grupo de risco molecular									0,29
Grupo de baixo risco	21	15,2	15	10,9	6	4,3			
Grupo de alto risco	117	84,8	73	52,9	44	31,9			
Blastos na MO, média	62,3		60,6		64,4				0,94
Intervalo	13-97		20-97		13-97				
WBC (x10 ⁹ /L), mediana	42900		34200		49000				0,41
Intervalo	600-300000		1200-300000		600-285700				
Hemoglobina (g/dL), média	7,9		8,1		7,6				0,37
Intervalo	3-12		3-12		5-12				
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	76466,6		42000		61000				0,17
Intervalo	4000-404000		4000-404000		8000-235000				

FAB: classificação French-American-British; WBC: White blood cells; FLT3-ITD: internal tandem duplication of the *FLT3* gene; NPM1: nucleophosmin. Dados perdidos foram excluídos do cálculo dos *P*-valores. ¹Nenhuma metáfase detectada. ²Os grupos de risco citogenético foram definidos de acordo com o Medical Research Council (MRC). ³ O grupo de alto risco molecular foi definido como NPM1 não mutado/FLT3-ITD negativo, NPM1 não mutado/FLT3-ITD positivo, ou NPM1 mutado/FLT3-ITD positivo. O grupo de baixo risco molecular foi definido pela presença de qualquer mutação no *NPM1* e pela ausência de mutações no *FLT3-ITD*.

A mediana de seguimento do estudo foi de 270 dias. Em cinco anos, A sobrevida global isolada dos 106 pacientes da coorte de recife e dos 42 pacientes da coorte de ribeirão Preto com LMA *de novo* foi de respectivamente 10,1% e 21,9% (figura 7), essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,76$). A SG estimada dos 148 pacientes com LMA *de novo*, foi de 15,9% (Figura 8A). A taxa de mortalidade nos três primeiros meses foi de 29,7%. Os pacientes que apresentavam ao menos um alelo variante (AG+GG) apresentaram uma SG estimada em 5 anos (SG-5 anos) de 18,7%, enquanto que os pacientes com genótipo selvagem

apresentaram uma SG-5 anos de 14,8%. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,65$) (Figura 9A).

Figura 7: Probabilidade da sobrevida global dos 148 pacientes com LMA de novo que realizaram o tratamento "3+7" comparando a coorte de Recife com a de Ribeirão Preto

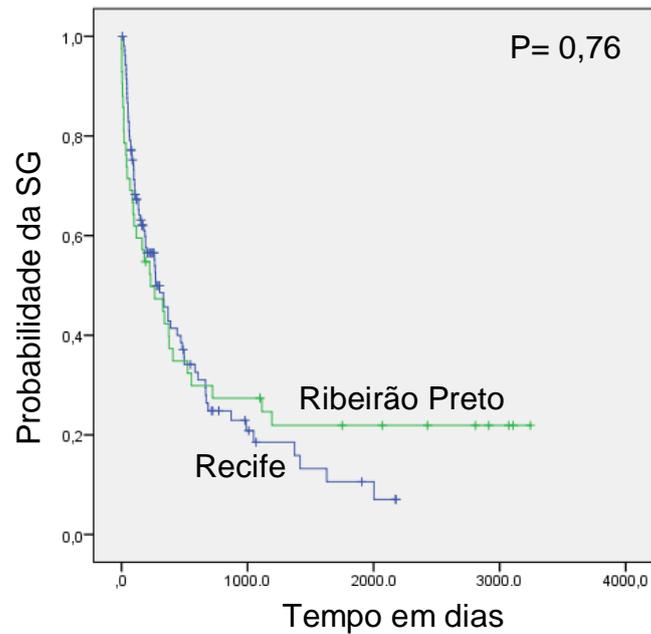


Figura 8A: Probabilidade da sobrevida global dos 148 pacientes com LMA de novo que realizaram o tratamento "3+7"

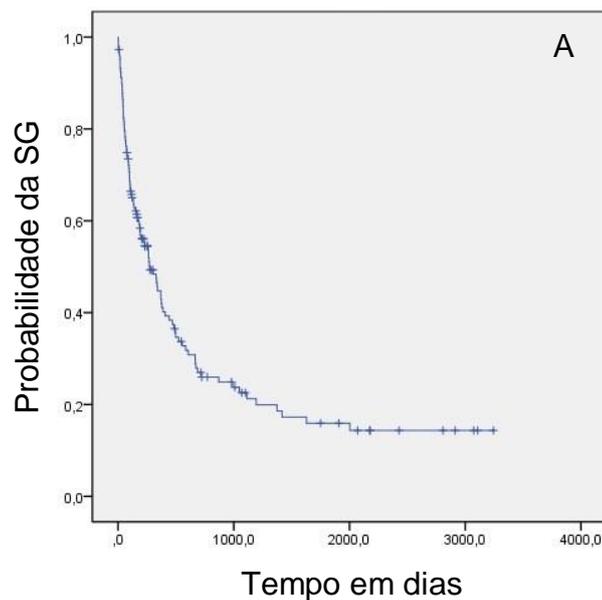
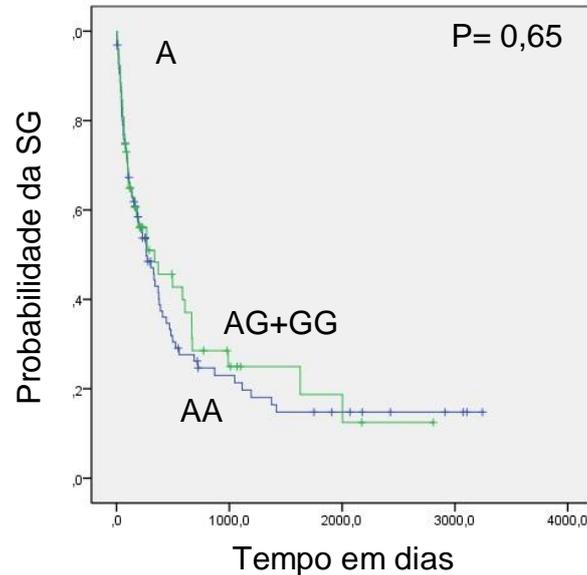


Figura 9A: Probabilidade da sobrevida global (SG) de 148 pacientes com LMA de novo que realizaram o tratamento 3+7 e que tiveram seus genótipos comparados pelo modelo dominante



Dos 148 pacientes incluídos para as análises de sobrevida 92 alcançaram a remissão completa (63,4%). A Tabela 5 mostra que, houve uma tendência para uma maior taxa de remissão completa do grupo com ao menos um alelo variante em relação ao grupo selvagem, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,08$).

Em cinco anos a sobrevida livre de doença dos 92 pacientes incluídos nessas análises foi de 23,9% (Figura 8B). Os pacientes com ao menos um alelo variante apresentaram uma SLD estimada em 5 anos de 24,2%, enquanto os pacientes com o genótipo selvagem apresentaram uma SLD estimada em 5 anos de 25%. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,92$) (Figura 9B).

Tabela 5: Taxa de remissão completa entre os genótipos AA versus AG+GG dos 148 pacientes incluídos nas análises de desfecho clínico.

	AA n=95 (Freq.)	AG+GG n=50 (Freq.)	P-Value
Remissão completa	-	-	0,08
Não	39 (0,37)	14 (0,25)	-
Sim	56 (0,63)	36 (0,75)	-
Dados perdidos	1	2	-

Figura 8B: Probabilidade da sobrevida livre de doença dos 92 pacientes com LMA de novo que alcançaram a remissão completa.

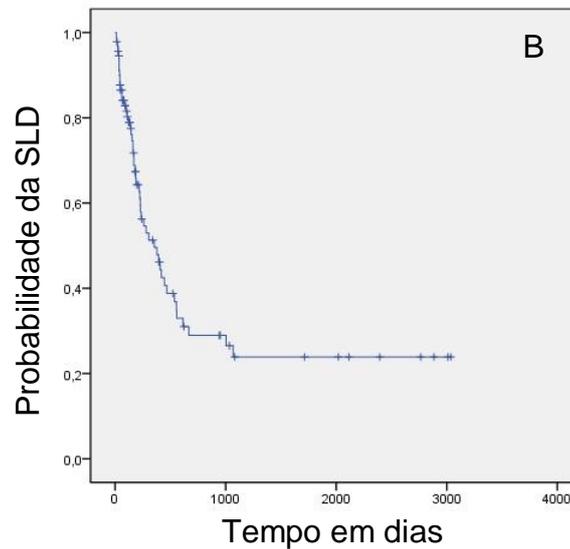
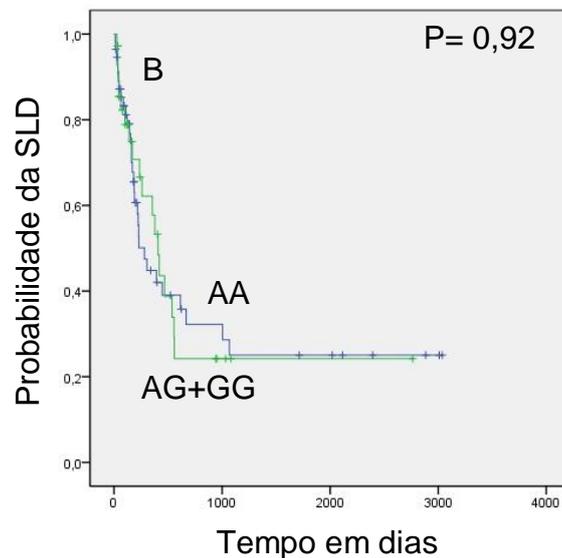


Figura 9B: Probabilidade da sobrevida livre de doença (SLD) de 92 pacientes com LMA de novo que alcançaram a remissão completa e que tiveram seus genótipos comparados pelo modelo dominante



Nós observamos que o SNP *WT1* rs16754 não apresentou impacto na SG, SLD e na RC, sendo assim não houve impacto desse polimorfismo no desfecho dos pacientes com LMA deste estudo. Luna e colaboradores (2012) também demonstraram que não houve diferenças dessas variáveis entre os

pacientes com genótipo selvagem em relação aos genótipos variantes. Em contrapartida, Chen e colaboradores (2012) demonstraram que os pacientes com genótipo GG obtiveram uma melhor SG e SLD quando comparados ao grupo com genótipo AA ou AG. Damm e colaboradores (2010) também descreveram um impacto favorável desse polimorfismo nos pacientes com LMA. Vale ressaltar que as diferenças nos estudos podem refletir a variabilidade genética das populações estudadas e as diferenças no número de pacientes incluídos nos estudos (Chen et al., 2012; Damm et al., 2010; Luna et al., 2012). Tivemos como limitações o baixo número de pacientes incluídos nas análises de sobrevida, pois muitos são encaminhados para o tratamento paliativo, ou vão a óbito antes do início da quimioterapia de indução padrão, sendo, portanto excluídos das análises. Temos como perspectivas futuras realizar um estudo funcional do polimorfismo rs 16754 do gene WT1.

6 CONCLUSÃO

1. Foi demonstrado que o polimorfismo *WT1* rs16754 está associado com um maior risco para a LMA.
2. Não houve diferença em relação às variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais entre os grupos AA e AG+GG para o polimorfismo *WT1* rs16754.
3. O SNP *WT1* rs16754 não apresentou impacto no desfecho dos pacientes com LMA, quando avaliadas a SG, SLD, e RC como variável de desfecho clínico.

REFERÊNCIAS

- Arber, D. A. (2019). The 2016 WHO classification of acute myeloid leukemia: What the practicing clinician needs to know. *Seminars in Hematology*, 56(2), 90–95. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.08.002>
- Aung, M. M. K., Mills, M. L., Bittencourt-Silvestre, J., & Keeshan, K. (2021). Insights into the molecular profiles of adult and paediatric acute myeloid leukaemia. *Molecular Oncology*, 15(9), 2253–2272. <https://doi.org/10.1002/1878->

0261.12899

- BENNETT, J. M. (1985). Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7). *Annals of Internal Medicine*, 103(3), 460. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-3-460>
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. - T, Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French- American- British (FAB) Co- operative Group. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. - T, Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1991). Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML- MO). *British Journal of Haematology*, 78(3), 325–329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1991.tb04444.x>
- Bernasconi, P. (2008). *Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia : relationships and distinctions – a review. June*, 695–708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07245.x>
- Betz, B. L., & Hess, J. L. (2010). Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 134(10), 1427–1433. <https://doi.org/10.5858/2010-0245-ra.1>
- Brien, E. C. O., Prideaux, S., & Chevassut, T. (2014). *The Epigenetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia. 2014.*
- Carvalho, Q. G. da S., Pedrosa, W. de A., & Sebastião, Q. P. (2011). Leucemia mieloide aguda versus ocupação profissional: perfil dos trabalhadores atendidos no Hospital de Hematologia de Recife. *Revista Da Escola de Enfermagem Da USP*, 45(6), 1446–1451. <https://doi.org/10.1590/s0080-62342011000600024>
- Chen, X., Yang, Y., Huang, Y., Tan, J., Chen, Y., Yang, J., Dou, H., Zou, L., Yu, J., & Bao, L. (2012). WT1 mutations and single nucleotide polymorphism rs16754 analysis of patients with pediatric acute myeloid leukemia in a Chinese population. *Leukemia and Lymphoma*, 53(11), 2195–2204. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.685732>
- Da Silva, G. C., Pilger, D. A., De Castro, S. M., & Wagner, S. C. (2006). Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42(2), 77–84. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000200004>

- Damm, F., Heuser, M., Morgan, M., Yun, H., Großhennig, A., Göhring, G., Schlegelberger, B., Döhner, K., Ottmann, O., Lübbert, M., Heit, W., Kanz, L., Schlimok, G., Raghavachar, A., Fiedler, W., Kirchner, H., Döhner, H., Heil, G., Ganser, A., & Krauter, J. (2010). Single nucleotide polymorphism in the mutational hotspot of WT1 predicts a favorable outcome in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 28(4), 578–585. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.0342>
- De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update.' *Blood Cancer Journal*, 6(7). <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.50>
- De Lima, M. C., Da Silva, D. B., Freund, A. P. F., Dacoregio, J. S., Costa, T. E. J. B., Costa, I., Faraco, D., & Silva, M. L. (2016). Acute Myeloid Leukemia: Analysis of epidemiological profile and survival rate. *Jornal de Pediatria*, 92(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.08.008>
- Deolinda, E., Pereira, R., Henrique, C., Silveira, A., Furtado, J. B., Bacal, N. S., Augusto, P., Silveira, A., Moyses, C. B., Sitnik, R., Renato, J., & Pinho, R. (2011). *Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia : review and case studies*. 9(11), 184–189.
- Desai, P., Mencia-trinchant, N., Savenkov, O., Simon, M. S., Cheang, G., Lee, S., Samuel, M., Ritchie, E. K., Guzman, M. L., Ballman, K. V, Roboz, G. J., & Hassane, D. C. (2018). leukemia years before diagnosis. *Nature Medicine*, 24(July). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0081-z>
- Deschler, B., & Lübbert, M. (2006). Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*, 107(9), 2099–2107. <https://doi.org/10.1002/cncr.22233>
- Dinardo, C. D., & Cortes, J. E. (n.d.). *Mutations in AML : prognostic and therapeutic implications*. 348–355.
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H. F., ... Bloomfield, C. D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4), 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>
- Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R. A., Lo-Coco, F., Naoe, T.,

- Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M. A., Sierra, J., Tallman, M. S., Löwenberg, B., & Bloomfield, C. D. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, *115*(3), 453–474. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>
- Estey, E. H. (2013). Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, *88*(4), 317–327. <https://doi.org/10.1002/ajh.23404>
- Estey, E. H. (2018). Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, *93*(10), 1267–1291. <https://doi.org/10.1002/ajh.25214>
- Frairia, C., Aydin, S., Audisio, E., Riera, L., Aliberti, S., Allione, B., Busca, A., D’Ardia, S., Dellacasa, C. M., Demurtas, A., Evangelista, A., Ciccone, G., Francia di Celle, P., Nicolino, B., Stacchini, A., Marmont, F., & Vitolo, U. (2017). Post-remissional and pre-transplant role of minimal residual disease detected by WT1 in acute myeloid leukemia: A retrospective cohort study. *Leukemia Research*, *61*(August), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.08.008>
- Ganzel, C., & Rowe, J. M. (2011). Prognostic Factors in Adult Acute Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *25*(6), 1163–1187. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2011.09.017>
- Gilliland, D. G., & Griffin, J. D. (2015). *Review article The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. *100*(5), 1532–1543. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0492>. Supported
- Grimwade, D., Hills, R. K., Moorman, A. V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A. H., Wheatley, K., Harrison, C. J., & Burnett, A. K. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: Determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, *116*(3), 354–365. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254441>
- Grossmann, V., Schnittger, S., Kohlmann, A., Eder, C., Roller, A., Dicker, F., Schmid, C., Wendtner, C. M., Staib, P., Serve, H., Kreuzer, K. A., Kern, W., Haferlach, T., & Haferlach, C. (2012). A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood*, *120*(15), 2963–2972. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-419622>

- Haferlach, T., & Schmidts, I. (2020). The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, *188*(1), 36–48. <https://doi.org/10.1111/bjh.16360>
- Hassan, H. T., & Rees, J. K. H. (1990). Auer Bodies in Acute Myeloid Leukaemia Patients. *Pathology Research and Practice*, *186*(2), 293–295. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)80547-9](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(11)80547-9)
- Hassan, K., Qureshi, M., Shafi, S., Ikram, N., & Akhtar, M. J. (1993). Acute myeloid leukemia-FAB classification and its correlation with clinico-haematological features. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, *43*(10), 200–203.
- Hecker, J., Miller, I., Götze, K. S., & Verbeek, M. (2018). Bridging strategies to allogeneic transplant for older AML patients. *Cancers*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/cancers10070232>
- Heerema-McKenney, A., & Arber, D. A. (2009). Acute Myeloid Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *23*(4), 633–654. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.003>
- Hidaka, D., Onozawa, M., Hashiguchi, J., Miyashita, N., Kasahara, K., Fujisawa, S., Hayase, E., Okada, K., Shiratori, S., Goto, H., Sugita, J., Nakagawa, M., Hashimoto, D., Kahata, K., Endo, T., Yamamoto, S., Tsutsumi, Y., Haseyama, Y., Nagashima, T., ... Teshima, T. (2018). Wilms Tumor 1 Expression at Diagnosis Correlates With Genetic Abnormalities and Polymorphism But Is Not Independently Prognostic in Acute Myelogenous Leukemia: A Hokkaido Leukemia Net Study. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, *18*(11), e469–e479. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.07.291>
- Ho, P. A., Kuhn, J., Gerbing, R. B., Pollard, J. A., Zeng, R., Miller, K. L., Heerema, N. A., Raimondi, S. C., Hirsch, B. A., Franklin, J. L., Lange, B., Gamis, A. S., Alonzo, T. A., & Meshinchi, S. (2011). WT1 synonymous single nucleotide polymorphism rs16754 correlates with higher mRNA expression and predicts significantly improved outcome in favorable-risk pediatric acute myeloid leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(6), 704–711. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.9327>
- Jacamo, R., Davis, R. E., Ling, X., Sonnylal, S., Wang, Z., Ma, W., Zhang, M., Ruvolo, P., Ruvolo, V., Wang, R. Y., McQueen, T., Lowe, S., Zuber, J., Kornblau, S. M., Konopleva, M., & Andreeff, M. (2017). Tumor Trp53 status and

- genotype affect the bone marrow microenvironment in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 8(48), 83354–83369. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19042>
- Kavianpour, M., Ahmadzadeh, A., Shahrabi, S., & Saki, N. (2016). Significance of oncogenes and tumor suppressor genes in AML prognosis. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5067-1>
- Khwaja, A., Bjorkholm, M., Gale, R. E., Levine, R. L., Jordan, C. T., Ehninger, G., Bloomfield, C. D., Estey, E., Burnett, A., Cornelissen, J. J., Scheinberg, D. A., Bouscary, D., & Linch, D. C. (2016). Acute myeloid leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(March). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.10>
- Liesveld, J. (2012). Management of AML: Who do we really cure? *Leukemia Research*, 36(12), 1475–1480. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.08.006>
- Look, A. T. (1997). *Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias*. 278(November).
- Luna, I., Such, E., Cervera, J., Barragán, E., Jiménez-Velasco, A., Dolz, S., Ibáñez, M., Gómez-Seguí, I., López-Pavía, M., Llop, M., Fuster, Ó., Oltra, S., Moscardó, F., Martínez-Cuadrón, D., Senent, M. L., Gascón, A., Montesinos, P., Martín, G., Bolufer, P., & Sanz, M. A. (2012). Analysis of SNP rs16754 of WT1 gene in a series of de novo acute myeloid leukemia patients. *Annals of Hematology*, 91(12), 1845–1853. <https://doi.org/10.1007/s00277-012-1596-x>
- Marchesi, F., Annibali, O., Cerchiara, E., Tirindelli, M. C., & Avvisati, G. (2011). Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: A concise review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 80(3), 331–346. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.11.006>
- Melchionda, F., Oncology, P., Spreafico, F., Unit, P. O., Hemato-oncology, P., Ciceri, S., Unit, G. T., Medicine, P., Lima, M., Unit, P. S., Collini, P., Pession, A., Massimino, M., Radice, P., & Perotti, D. (2013). LETTER TO THE EDITOR A Novel WT1 Mutation in Familial Wilms Tumor. *Pediatric Blood & Cancer*, February, 1388–1389. <https://doi.org/10.1002/pbc>
- Mrózek, K., Heinonen, K., & Bloomfield, C. D. (2001). Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 14(1), 19–47. <https://doi.org/10.1053/beha.2000.0114>
- Narayanan, D., & Weinberg, O. K. (2020). How I investigate acute myeloid leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, 42(1), 3–15. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13135>

- Olson, O. C., Kang, Y. A., & Passegué, E. (2020). Normal hematopoiesis is a balancing act of self-renewal and regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *10*(12), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035519>
- Petiti, J., Rosso, V., Lo Iacono, M., Calabrese, C., Signorino, E., Gaidano, V., Berger, M., Saglio, G., & Cilloni, D. (2018a). Prognostic significance of The Wilms' Tumor-1 (WT1) rs16754 polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, *67*(October 2017), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.01.016>
- Petiti, J., Rosso, V., Lo Iacono, M., Calabrese, C., Signorino, E., Gaidano, V., Berger, M., Saglio, G., & Cilloni, D. (2018b). Prognostic significance of The Wilms' Tumor-1 (WT1) rs16754 polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, *67*(October 2017), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.01.016>
- Petiti, J., Rosso, V., Lo Iacono, M., Calabrese, C., Signorino, E., Gaidano, V., Berger, M., Saglio, G., & Cilloni, D. (2018c). Prognostic significance of The Wilms' Tumor-1 (WT1) rs16754 polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, *67*(January), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.01.016>
- Prada-Arismendy, J., Arroyave, J. C., & Röthlisberger, S. (2017). Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, *31*(1), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.08.005>
- Puumala, S. E., Ross, J. A., Aplenc, R., & Spector, L. G. (2013). Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatric Blood and Cancer*, *60*(5), 728–733. <https://doi.org/10.1002/pbc.24464>
- Rampal, R., & Figueroa, M. E. (2016). Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *101*(6), 672–679. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.141796>
- Renneville, A., Boissel, N., Helevaut, N., Nibourel, O., Terré, C., Pautas, C., Gardin, C., Thomas, X., Turlure, P., Reman, O., Berthon, C., Dombret, H., Castaigne, S., & Preudhomme, C. (2011). Wilms' tumor 1 single-nucleotide polymorphism rs16754 does not predict clinical outcome in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *25*(12), 1918–1921. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.173>
- Renneville, Aline, Boissel, N., Zurawski, V., Llopis, L., Biggio, V., Nibourel, O., Philippe, N., Thomas, X., Dombret, H., & Preudhomme, C. (2009). Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults

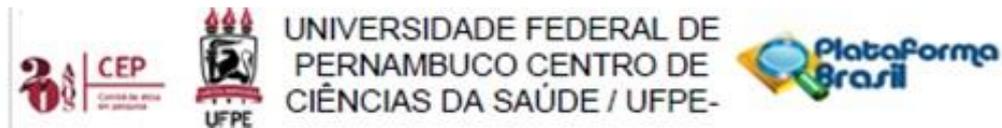
- with acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association. *Cancer*, 115(16), 3719–3727. <https://doi.org/10.1002/cncr.24442>
- Rieger, M. A., & Schroeder, T. (n.d.). *Hematopoiesis*. 1–18.
- Rocha, A. et al. (2007). Possati AR, Ribeiro PMK, Luiza AM, Zanini LMM. Polimorfismos Genéticos: Implicações na Patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 51(5), 723–730. <http://www.scielo.br/pdf/abem/v51n5/a09v51n5.pdf>
- Rubnitz, J. E., Gibson, B., & Smith, F. O. (2010). Acute Myeloid Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 24(1), 35–63. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.11.008>
- Sauna, Z. E., Kimchi-Sarfaty, C., Ambudkar, S. V., & Gottesman, M. M. (2007). Silent polymorphisms speak: How they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Research*, 67(20), 9609–9612. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2377>
- Schmid, D., Heinze, G., Linnerth, B., Tisljar, K., Kusec, R., Geissler, K., Sillaber, C., Laczika, K., Mitterbauer, M., Zöchbauer, S., Mannhalter, C., Haas, O. A., Lechner, K., Jäger, U., & Gaiger, A. (1997). Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 11(5), 639–643. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400620>
- Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., & Zeidan, A. M. (2019). Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*, 36, 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.04.005>
- Shastry, B. S. (2009). Single Nucleotide Polymorphisms: Impact on Gene Function & Phenotype. *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods & Protocols*, 578, 1–22. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1>
- Stefanidis, C. J., & Querfeld, U. (2011). The podocyte as a target: Cyclosporin A in the management of the nephrotic syndrome caused by WT1 mutations. *European Journal of Pediatrics*, 170(11), 1377–1383. <https://doi.org/10.1007/s00431-011-1397-6>
- Takahashi, S. (2011). *Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia _ Journal of Hematology & Oncology _ Full Text*. 1–11.
- Toogeh, G., Ramzi, M., Faranoush, M., Amirizadeh, N., Haghpanah, S., Moghadam, M., & Cohan, N. (2016). Prevalence and Prognostic Impact of Wilms' Tumor 1 (WT1) Gene, Including SNP rs16754 in Cytogenetically Normal Acute

- Myeloblastic Leukemia (CN-AML): An Iranian Experience. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 16(3), e21–e26.
<https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.11.017>
- Vardiman, J. W., Harris, N. L., & Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), 2292–2302. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1199>
- Walter, R. B., Othus, M., Burnett, A. K., Löwenberg, B., Kantarjian, H. M., Ossenkoppele, G. J., Hills, R. K., Van Montfort, K. G. M., Ravandi, F., Evans, A., Pierce, S. R., Appelbaum, F. R., & Estey, E. H. (2013). Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: Analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*, 121(13), 2424–2431. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-462440>
- Yang, L., Han, Y., Saurez Saiz, F., & Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: The WT1 story. *Leukemia*, 21(5), 868–876.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404624>
- Yu, X., Zhang, Y., Liu, S., Mu, Y., Shang, F., & Zhang, N. (2020). Association between the Wilms tumor-1 rs16754 polymorphism and acute myeloid leukemia: A MOOSE-compliant meta-analysis. *Medicine*, 99(27), e20713.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000020713>
- Zia, S. Y., Rodak, B., Fritsma, G., Keohane, E., Hakim, R. F., Fakhurrrazi, Dinni, Zhang, C., He, Y., Chen, Z., Shi, J., Qu, Y., Zhang, J., Azis, H. A., Taher, M., Ahmed, A. S., Sulaiman, W. M. A. W., Susanti, D., Chowdhury, S. R., ... Hasanpour, M. (2017). Chapter 7: Hematopoiesis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(2), 247–257.
https://books.google.com/books/about/Hematology_E_Book.html?id=-tHsAwAAQBAJ

ANEXOS

ANEXO A

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 77527717.4.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.412.470

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa do Professor ANTONIO ROBERTO LUCENA DE ARAUJO, vinculado ao Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco. O projeto será desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da UFPE, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Hospital de Câncer de Pernambuco, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). A proposta consiste basicamente na análise da hipótese: A caracterização molecular dos pacientes com LMA poderá ser de valor clínico significativo, no que diz respeito ao prognóstico. Alterações moleculares específicas poderão ainda, estar associadas a subtipos ou características clinico-laboratoriais da LMA. Para este fim realizar-se-á um estudo do tipo coorte retrospectivo e prospectivo.

O estudo será do tipo coorte retrospectivo e prospectivo. Serão incluídos 300 pacientes adultos com LMA, diagnosticados de março de 2010 a dezembro de 2020. Esses pacientes serão diagnosticados e acompanhados no Hospital de Hematologia e Hemoterapia da Fundação Hemope, no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), seguindo os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os pacientes serão maiores de 18 anos. Em todos os pacientes serão coletadas amostras de medula óssea e/ou sangue periférico no

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

ANEXO B

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética da Fundação Hemope

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 77527717.4.3001.5195

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

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.644.746

Apresentação do Projeto:

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

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

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

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

ANEXO C

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética do Hospital do Câncer de Pernambuco

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 77527717.4.3003.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.656.851

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado: IMPACTO PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA DO ADULTO, esta sendo apresentado na sua terceira versão 3

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o panorama genético de pacientes adultos com leucemia mieloide aguda (LMA), bem como seu impacto prognóstico nos principais desfechos clínicos da doença (remissão, recaída e morte).

Objetivo Secundário:

- Determinar a frequência de mutações/polimorfismos nos genes NPM1, FLT3, CEBPA, WT1, MLL, IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1 e TP53 e determinar o significado prognóstico desses achados, utilizando a sobrevida global como desfecho;
- Determinar a expressão gênica relativa dos genes BAALC, ERG, EVI1, KMT2E, ID1 e MN1, escolher um ponto de corte ideal (cutt off) para esses genes e determinar o significado prognóstico desses achados, utilizando a sobrevida global como desfecho;
- Determinar o número de cópias de mtDNA e o significado prognóstico desse achado, utilizando a sobrevida global como desfecho;
- Determinar o valor aditivo desses achados com base na proporção de risco de cada marcador molecular (índice prognóstico integrado, IPI) na predição dos principais desfechos clínicos da doença (remissão, recaída e morte);

Endereço: Av. Cruz Cabuga, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

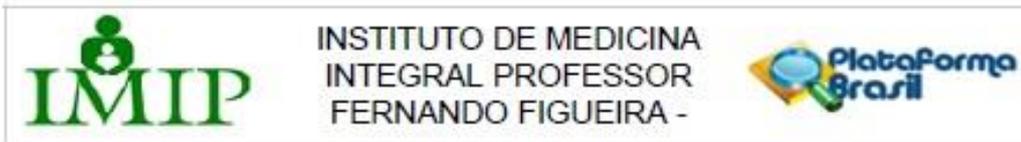
Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

ANEXO D

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Antonio Roberto Luena de Araujo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 77527717.4.3002.5201

Instituição Proponente: Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP/PE

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.195.998

Apresentação do Projeto:

O estudo será do tipo coorte retrospectivo e prospectivo. Serão incluídos, neste estudo, pacientes adultos com LMA, diagnosticados de março de 2010 a dezembro de 2020, pretendendo incluir um total de 300 pacientes. Esses pacientes serão diagnosticados e acompanhados no Hospital de Hematologia e Hemoterapia da Fundação Hemope, no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), seguindo os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os pacientes serão maiores de 18 anos e submetidos ao esquema de tratamento 3+7 (LIMA et al., 2015). O seguimento dos pacientes será censurado/atualizado em março de 2021 e para aqueles em que o seguimento foi perdido serão censurados na última data em que sabidamente estavam vivos. Para as análises moleculares dos pacientes com LMA, serão utilizadas amostras de medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP), desde que este último apresente mais de 80% de blastos leucêmicos circulantes. Essas amostras são coletadas no momento do diagnóstico e somente o material excedente será utilizado na pesquisa. Para as análises de expressão gênica e do número de cópias de mtDNA, serão utilizadas, como controle saudável, amostras de 4mL de SP e 5mL de MO de 20 indivíduos saudáveis. Entende-se por indivíduo saudável aquele que não apresentar nenhuma doença hematológica ou oncológica. O processamento das amostras será realizado no Laboratório Central da UFPE e no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Para obtenção dos dados clínicos, serão utilizados os

Endereço: Rua dos Coelhos, 300			
Bairro: Boa Vista		CEP: 50.070-902	
UF: PE	Município: RECIFE		
Telefone: (81)2122-4756	Fax: (81)2122-4782	E-mail: comitedeetica@imip.org.br	