



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA

AIDA MAYRA GUEDES DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *AURKA*, *AURKB* E *AURKC* EM
PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

Recife
2020

AIDA MAYRA GUEDES DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *AURKA*, *AURKB* E *AURKC* EM
PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

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

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof^o. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo

Coorientador: Prof^o. Dr. Marcos André Cavalcanti

Bezerra

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Andrade, Aida Mayra Guedes de

Avaliação da expressão dos genes AURKA, AURKB e AURKC em pacientes adultos com leucemia mielóide aguda / Aida Mayra Guedes de Andrade - 2020.

93 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo

Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2020.

Inclui referências, apêndice e anexos.

1. Leucemia mielóide aguda 2. Citogenética 3. Expressão gênica
I. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (Orientador) II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Coorientador) III. Título

616.99419 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-234

AIDA MAYRA GUEDES DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *AURKA*, *AURKB* E *AURKC* EM
PACIENTE ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

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

Aprovada em: 31/08/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Manuela Freire Hazin Costa
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Juely e Edmundo, por todo o apoio que sempre me foi dado, me permitindo voar para onde fosse, pois sempre teria pra onde voltar;

A minha filha Luiza, por ser minha parceira de caminhada, sempre comigo em qualquer situação, me animando e me impulsionando a ser sempre melhor;

A minha irmã Eyne e meu sobrinho Miguel por todas as risadas e bons momentos, deixando tudo mais leve;

Ao meu namorado, companheiro, parceiro da vida inteira, Rodrigo, por aguentar todos os estresses, desabafos e surtos com todo o amor e acolhimento, me dando força e nunca me deixando esquecer quem eu sou;

Ao meu orientador Professor Dr. Antonio Roberto, por ter acreditado em mim desde o começo e ter aceitado embarcar nessa loucura que é o mestrado;

Ao meu coorientador Professor Dr. Marcos André, pelo apoio, puxões de orelha e brincadeiras;

A minha eterna coorientadora, Mariana, por todos os conselhos, conversas e pela amizade de sempre;

A todos os membros do NHCL, em especial a Pedro, pelo suporte técnico, científico e principalmente pela amizade. Deixo um agradecimento especial para Gabriela que esteve ao meu lado em cada etapa da construção desta dissertação, sempre disposta a me ajudar e assim, me permitindo sentir que não estava só;

Aos meus amigos, pelas risadas, momentos de descontração, conversas e por todos os momentos que compartilhamos;

À UFPE e ao Programa de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade de crescimento profissional e científico;

Ao CNPq pelo apoio financeiro fornecido;

Ao HEMOPE e HCP e seus funcionários pelo apoio e infraestrutura cedidos e aos pacientes com leucemia mieloide aguda, que voluntariamente se dispuseram a participar desta pesquisa;

Por fim, a todos aqueles que não foram citados aqui, mas que definitivamente fizeram parte dessa caminhada, contribuindo para minha formação profissional e humana.

RESUMO

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença clonal, onde as células progenitoras hematopoiéticas perdem a capacidade de se diferenciar terminalmente e de responderem a estímulos de apoptose e proliferação, sendo o tipo de leucemia mais comum no mundo. Alterações cromossômicas ao diagnóstico constituem o principal fator prognóstico independente na LMA. Embora a maioria dos casos apresentem cariótipo normal ao diagnóstico (45-55% dos casos), cerca de 20% dos pacientes apresenta alterações cromossômicas estruturais e numéricas, cuja causas permanecem desconhecidas. A expressão alterada de proteínas responsáveis pela formação do fuso mitotótico e centrômero, tendo como principais representantes os membros da família das auroras quinases (*AURKA*, *AURKB* e *AURKC*), podem estar envolvidas nesse processo. A proposta desse trabalho foi associar a expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* com alterações cromossômicas (estruturais e numéricas) ao diagnóstico de pacientes adultos com LMA. Quatro coortes independentes foram analisadas (Recife: 69 pacientes, TCGA: 155 pacientes, Beat-AML: 326 pacientes, GSE: 420 pacientes). A hiperexpressão de *AURKA* foi associada com cariótipo alterado em pacientes alocados nas coortes TCGA e GSE, enquanto que a expressão do gene *AURKB* apresentou uma associação com cariótipo complexo e tendência de aumento em todas as coortes quanto a presença de translocações/inversões cromossômicas. *AURKC* não foi associado com nenhum achado citogenético. Embora ainda seja prematuro afirmar que a expressão aberrante dos genes *AURKA* e *AURKB* estejam associadas com alterações cromossômicas específicas na LMA, nossos dados apontam para um possível, mas ainda inexplorado papel destes genes na apresentação cariôtípica de pacientes adultos ao diagnóstico.

Palavras-Chave: Leucemia Mielóida Aguda. Citogenética. AURKs.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a clonal disease, where hematopoietic progenitor cells lose their ability to differentiate terminally and respond to stimuli of apoptosis and proliferation, being the most common type of leukemia in the world. Chromosomal changes in diagnosis are the main independent prognostic factor in AML. Although most cases have a normal karyotype at diagnosis (45-55% of cases), about 20% of patients have structural and numerical chromosomal changes, the causes of which remain unknown. The aberrant expression of proteins responsible for the formation of the mitotic spindle and centromere, having as main representatives the aurora kinase family members (AURKA, AURKB and AURKC), may be involved in this process. The purpose of this work was to associate the expression of these genes with chromosomal changes (structural and numerical) to the diagnosis of adult patients with AML. Four independent cohorts were analyzed (Recife: 69 patients, TCGA: 155 patients, Beat-AML: 326 patients, GSE: 420 patients). AURKA hyperexpression was associated with altered karyotype in patients allocated to the TCGA and GSE cohorts, while the expression of the AURKB gene showed an association with complex karyotype and an increasing trend in all cohorts regarding the presence of chromosomal translocations / inversions. AURKC was not associated with any cytogenetic findings. Although it is still premature to state that the aberrant expression of the AURKA and AURKB genes are associated with specific chromosomal changes in AML, our data point to a possible, but still unexplored role of these genes in the karyotype presentation of adult patients at diagnosis.

Key words: Acute myeloid leukemia. Cytogenetics. AURKs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esfregaço de medula óssea de um paciente com leucemia mielóide aguda ao diagnóstico. Rueda <i>et al.</i> (2004)	21
Figura 2 - Fluxograma da Hematopoiese, da célula-tronco hematopoiética até as células maduras. Adaptado de Seldin e Sloan (2015).....	23
Figura 3 - Paciente com leucemia mielóide aguda apresentando o cariótipo 46,XY,add(8)(q24),t(15;17)(q22;q21). Adaptado de Sagrillo <i>et al.</i> (2005).....	24
Figura 4 - Esquema do modelo "two-hit" proposto por Gilliland. Adaptado de Gilliland <i>et al.</i> (2002).....	26
Figura 5 - Estrutura e domínios das AURKs. Seus domínios N-terminal e C-terminal contém locais de ligação do fator de transcrição (do <i>inglês transcriptional factor binding sites</i> – TFBS) do D-box e do KEN enquanto o domínio central das quinases contribuem para a atividade catalítica. O domínio central também contém um TFBS essencial como o resíduo de ativação (loop de ativação). Adaptado de Goldenson e Crispino (2015).....	35
Figura 6 - Deslocamento da localização celular de Aurora quinases na mitose (AURKC não é mostrado devido à localização e função celular incerta). Adaptado de Carmena e Earnshaw (2003).	36
Figura 7 - Localização cromossômica dos genes da família AURK: (A) AURKA no 20q13.2, (B) AURKAB no 17p13.1 e (C) AURKC no 19q13. Adaptado de NCBI (2019). .	38
Figura 8 - Expressão de <i>AURKA</i> nos diferentes tipos de células e nas translocações mais bem definidas da LMA. AML t(15;17) - t(15;17) na LMA; AML inv(16)/t(16;16) –inv(16) na LMA; AML t(8;21) – t(8;21); AML t(11q23)/MLL – t(11q23)/MLL na LMA; AML complex – LMA cariótipo complexo; HSC – células-tronco hematopoiéticas; MPP – progenitores multipotenciais; CMP – Célula progenitora mieloide comum; GMP – Progenitores granulocíticos-monocíticos; MEP – Célula progenitora Megacariocítica-eritroide; Early_PM – Promielócito imaturo; Late_PM – Promielócito maduro; MY – Mielócito; MM – Metamielócitos; BC – Bastão; PMN - Polimorfos nucleares maduros; Mono – Monócitos.	

Bagger <i>et al.</i> (2018).....	49
Figura 9 - Expressão de <i>AURKB</i> nos diferentes tipos de células e nas translocações mais bem definidas da LMA. AML t(15;17) - t(15;17) na LMA; AML inv(16)/t(16;16) –inv(16) na LMA; AML t(8;21) – t(8;21); AML t(11q23)/MLL – t(11q23)/MLL na LMA; AML complex – LMA cariótipo complexo; HSC – células-tronco hematopoiéticas; MPP – progenitores multipotenciais; CMP – Célula progenitora mieloide comum; GMP – Progenitores granulocíticos-monocíticos; MEP – Célula progenitora Megacariocítica-eritroide; Early_PM – Promielócito imaturo; Late_PM – Promielócito maduro; MY – Mielócito; MM – Metamielócitos; BC – Bastão; PMN - Polimorfos nucleares maduros; Mono – Monócitos. Bagger <i>et al.</i> (2018).....	50
Figura 10 - Expressão de <i>AURKC</i> nos diferentes tipos de células e nas translocações mais bem definidas da LMA. AML t(15;17) - t(15;17) na LMA; AML inv(16)/t(16;16) – inv(16) na LMA; AML t(8;21) – t(8;21); AML t(11q23)/MLL – t(11q23)/MLL na LMA; AML complex – LMA cariótipo complexo; HSC – células-tronco hematopoiéticas; MPP – progenitores multipotenciais; CMP – Célula progenitora mieloide comum; GMP – Progenitores granulocíticos-monocíticos; MEP – Célula progenitora Megacariocítica-eritroide; Early_PM – Promielócito imaturo; Late_PM – Promielócito maduro; MY – Mielócito; MM – Metamielócitos; BC – Bastão; PMN - Polimorfos nucleares maduros; Mono – Monócitos. Bagger <i>et al.</i> (2018).....	51
Figura 11 - Distribuição dos pacientes nos diferentes tipos de translocações e cariótipo complexo (CC) – coorte TCGA.	52
Figura 12 - Distribuição dos pacientes nos diferentes tipos de translocações e cariótipo complexo (CC) – coorte Beat-AML.	53
Figura 13 - Distribuição dos pacientes nos diferentes tipos de translocações e cariótipo complexo (CC) – coorte GSE.....	54
Figura 14 - Distribuição dos pacientes nos diferentes tipos de translocações e cariótipo complexo da LAM - coorte Recife.	54
Figura 15 - Associação da expressão de (a) <i>AURKA</i> e (b) <i>AURKB</i> (log2) com a	

classificação da FAB - coorte TCGA.....	55
Figura 16 - Gráfico demonstrando a associação de AURKA com os cariótipos Normal e Alterado.	56
Figura 17 - Gráficos de dispersão de (a) AURKA, (b) AURKB e (c) AURKC, com os diferentes grupos cariótipos, da coorte TCGA.....	57
Figura 18 - Gráficos de dispersão dos genes (a) AURKA, (b) AURKB e (c) AURKC entre os diferentes grupos cariótipos (cariótipo normal, cariótipo complexo, translocações/inversões e adições/deleções) da coorte Beat-AML.....	59
Figura 19 - Representação dos grupos cariótipos divididos pela mediana do gene <i>AURKB</i>	60
Figura 20 - Gráficos de dispersão dos genes (a) AURKA, (b) AURKB e (c) AURKC entre os diferentes grupos cariótipos (cariótipo normal, cariótipo complexo, translocações/inversões e adições/deleções) da coorte GSE.	62
Figura 21 - Representação gráfica da associação dos indivíduos dos diferentes grupos cariótipos com os genes (a) AURKA e (b) AURKB.	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Ferramentas de diagnóstico e prognóstico da leucemia mielóide aguda. Adaptado de Tallman <i>et al.</i> (2019).....	27
Quadro 2 - Classificação OMS-2016 de leucemia mielóide aguda e neoplasias relacionadas. Adaptado de Arber <i>et al.</i> (2016).....	30
Quadro 3 - Discriminação dos principais rearranjos cromossômicos de prognóstico favorável e desfavorável presentes na LMA. Adaptado de Dohner <i>et al.</i> (2017).....	32
Quadro 4 - Estratificação de risco do grupo European LeukemiaNet (ELN), relacionando as anormalidades genéticas aos grupos de risco. Adaptado de Dohner <i>et al.</i> (2017).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínico-laboratoriais de pacientes das coortes Recife, TCGA, Beat-AML e GSE.....	48
Tabela 2 - Comparação entre os genes AURKA, AURKB e AURKC, dividido em Cariótipo normal e Cariótipo alterado, separados pela mediana.	55
Tabela 3 - Distribuição por quartis da associação dos três genes alvo com os diferentes grupos cariótipos do banco de dados TCGA.....	57
Tabela 4 - Distribuição de pacientes da coorte Beat-AML divididos pela mediana em dois grupos cariótipos.	58
Tabela 5 - Distribuição, em quartis, dos pacientes da coorte Beat-AML com quatro grupos cariótipos	58
Tabela 6 - Pacientes da coorte GSE divididos em dois grupos cariótipos (CN e Cariótipo Alterado).....	60
Tabela 7 - Distribuição por quartis da associação dos três genes alvo com os diferentes grupos cariótipos do banco de dados GSE.	61
Tabela 8 - Comparação entre os genes dividido em cariótipo normal e cariótipo alterado, separados pela mediana, pertencentes à coorte Recife.....	63
Tabela 9 - Distribuição, em quartis dos pacientes da coorte Recife com quatro grupos cariótipos.	63
Tabela 10 - Análise combinada das AURKs na coorte TCGA.	64
Tabela 11 - Análise combinada de AURKA, AURKB e AURKC na coorte GSE.	65
Tabela 12 - Análise combinada de AURKA e AURKB na coorte Recife.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
AURK	Aurora quinase
AURKA	Aurora quinase A
AURKB	Aurora quinase B
AURKC	Aurora quinase C
CC	Cariótipo complexo
CN	Cariótipo normal
CEBPA	Proteína alfa de ligação ao estimulador de CCAAT (do inglês <i>CCAAT enhancer binding protein alpha</i>)
CCS/UFPE	Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco
cDNA	DNA complementar
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPC	Complexo passageiro de cromossomo (do inglês <i>chromosome passenger complex</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECOG	Grupo cooperativo oriental de oncologia (do inglês <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>)
ELN	European LeukemiaNet
FAB	Sistema Franco-Americano-Britânico
FACS	Ordenação de células ativadas por fluorescências (do inglês <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>)
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência

FLT3	Tirosino-quinase 3 relacionado ao FMS
GAPDH	gliceraldehido 3-phosphato desidrogenase
h	Hora
HCP	Hospital do Câncer de Pernambuco
HEMOPE	Hospital de Hematologia de Pernambuco
INCA	Instituto Nacional do Câncer
inv	Inversão
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana(do inglês <i>International System of Human Cytogenetic Nomenclature</i>)
ITD	Duplicação <i>in tandem</i> (do inglês <i>internal tandem duplication</i>)
KCl	Cloreto de potássio
KPS	Escala de status performance de Karnofsky (do inglês <i>Karnofsky performance status scale</i>)
LABCEN-UFPE	Labortório Central da Universidade Federal de Pernambuco
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMA-CN	Leucemia mielóide aguda de cariótipo normal
LPA	Leucemia promielocítica aguda
mL	Mililitro
MO	Medula óssea
MRC	Medical Research Council
NMP1	Nucleofosmina 1 (do inglês <i>nucleophosmin 1</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Valor de p
p	Braço curto do cromossomo

q	Braço longo do cromossomo
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação quantitativa em cadeia polimerase em tempo real (do inglês, <i>Real-Time Quantitative PCR</i>)
SAC	Ponto de verificação da montagem do fuso (do inglês <i>spindle assembly checkpoint</i>)
SMD	Síndrome mielodisplásica
SP	Sangue periférico
t	Translocação
TCGA	O atlas genômico do câncer (do inglês <i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	Objetivo Geral	20
1.1.2	Objetivos Específicos.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA.....	21
2.2	FISIOPATOGENIA DA LMA	22
2.3	DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA LMA.....	26
2.4	FATORES PROGNÓSTICOS DA LMA	30
2.5	AURORA QUINASES	34
2.5.1	Localização e funções das Aurora quinases.....	35
2.5.2	Aurora quinases no câncer.....	37
2.6	BANCOS DE DADOS	40
2.6.1	The Cancer Genome Atlas (TCGA).....	40
2.6.2	Beat-AML	41
2.6.3	Genetics Selection Evolution (GSE).....	41
2.6.4	Banco de células Bloodspot	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1	DESENHO DE ESTUDO E SELEÇÃO DE PACIENTES.....	43
3.2	ASPECTOS ÉTICOS	43
3.3	COLETA DE MATERIAL.....	44
3.4	ANÁLISE CITOGENÉTICA	44
3.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	45
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46

4	RESULTADOS.....	48
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS COORTES.....	48
4.2	COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>AURKA</i> , <i>AURKB</i> E <i>AURKC</i> EM CÉLULAS LEUCÊMICAS E HEMATOPOIESE NORMAL.....	48
4.3	ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>AURK</i> COM CARIÓTIPO NAS COORTES TCGA, BEAT-AML E GSE.....	55
4.3.1	Coorte TCGA.....	55
4.3.2	Coorte Beat-AML.....	57
4.3.3	Coorte GSE.....	59
4.4	ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>AURK</i> COM CARIÓTIPO NA COORTE RECIFE.....	62
4.5	ANÁLISE COMBINADA DAS <i>AURKS</i> NAS COORTES TCGA, GSE E RECIFE.....	64
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	APÊNDICE A - TABELA SUPLEMENTAR.....	83
	ANEXO A - PARECERES DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	84
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	87
	CURRICULUM VITAE (LATTES).....	90

1 INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide aguda (LMA), doença clonal de curso clínico heterogêneo, se caracteriza pela incapacidade das células progenitoras hematopoiéticas (blastos) 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 se dirigir para o sangue periférico e infiltrar outros órgãos e tecidos. A perda de função e substituição das células normais da medula óssea resulta em anemia, trombocitopenia e diminuição da contagem de leucócitos normais, resultando sintomas característicos como: fraqueza, aparecimento de petéquias¹, sangramentos e dor óssea. A LMA possui diferentes subtipos, com apresentações clínicas semelhantes, porém com características morfológicas, citogenéticas e imunofenotípicas diferentes, levando a curso clínico e respostas terapêuticas distintas e heterogêneas.

Do ponto de vista molecular, a LMA é uma doença genética, pois está associada à ocorrência de alterações citogenéticas, mutações somáticas recorrentes, mudanças na expressão gênica ou na regulação epigenética, porém também são necessários fatores ambientais. A leucemogênese pode estar associada ao acúmulo de modificações gênicas, as quais conferem ao clone leucêmico vantagem proliferativa e perda da capacidade de resposta a sinais de diferenciação e morte celular.

Atualmente, alterações cromossômicas ao diagnóstico constituem o principal fator de risco da LMA, sendo capaz de determinar, de maneira

¹Petéquias são pequenas lesões vermelhas causadas quando há vazamento de sangue para a pele pelos capilares. Eles não empalidecem quando pressão é aplicada e geralmente começam nas áreas dependentes do corpo, como as pernas. Petéquias maiores que 0,5 cm são púrpuras, às vezes, essas lesões são elevadas (palpáveis). Santistevan *et al.* (2017).

independente, o prognóstico do paciente. Essas alterações cromossômicas ocorrem em aproximadamente 45-55% de pacientes adultos com LMA *de novo*, ou seja, pacientes que apresentam a doença pela primeira vez, de maneira independente. Em 15% a 20% dos pacientes, é observado o cariótipo complexo, definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como todo cariótipo contendo três ou mais alterações cromossômicas no mesmo clone, estando frequentemente associado com um pior desfecho clínico e refratariedade ao tratamento.

Ainda não está bem estabelecido o que leva um clone leucêmico a apresentar esta instabilidade cromossômica ou propensão a desenvolver um cariótipo complexo. Estudos sugerem que a expressão alterada de genes que codificam proteínas responsáveis pela formação do fuso mitotótico e centrômero possam estar envolvidas neste processo. Nesse sentido, as auroras quinases (Aurk) desempenham papel fundamental na regulação da mitose e controle da citocinese, com um pico de atividade durante a fase G2/M do ciclo celular. Os genes codificadores destas proteínas (*AURKA*, *AURKB* e *AURKC*) estão envolvidos em diversas neoplasias. Além disso, a expressão alterada destes genes foi descrita como um marcador de prognóstico adverso em vários tumores sólidos (estômago, pulmão, próstata) e pode estar associada com a instabilidade cromossômica, levando a uma segregação anormal de cromossomos ou poliploidia.

Diante do exposto, tendo em vista que as AURKs estão envolvidas nos processos do ciclo celular, é possível que uma expressão alterada desses genes possa levar a um quadro de instabilidade cromossômica na LMA.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Associar a expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* com alterações cromossômicas de pacientes adultos com LMA.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Determinar as alterações cromossômicas nesses pacientes e categorizá-los entre os diferentes grupos de cariótipos;
2. Determinar a expressão relativa dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* e comparar entre os diferentes grupos de cariótipos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

A leucemia mielóide aguda (LMA), o tipo de leucemia aguda mais comum em adultos, é uma malignidade hematopoiética heterogênea e agressiva (Hasserjian, 2013; De Kouchkovsky e Abdul-Hay, 2016; Saultz e Garzon, 2016), que pode ser diferenciada em subtipos baseados na natureza (muitas vezes citogenética) do evento leucemogênico inicial (Lazarus e Litzow, 2012; Hou *et al.*, 2013; Hasserjian, 2013; Saultz e Garzon, 2016).

A expansão clonal de blastos mielóides no sangue periférico (SP), medula óssea (MO) e / ou outros tecidos acontece e conseqüentemente, pacientes com LMA podem apresentar sinais e sintomas relacionados à pancitopenia (diminuição nas três linhas de células sanguíneas – hemácias, glóbulos brancos e plaquetas), que incluem infecções, febre, fraqueza, fadiga e achados hemorrágicos como petéquias, menorragia e sangramento nasal (Estey, 2013; Tallman *et al.*, 2019). A proliferação de células malignas gradualmente toma conta das células sanguíneas normais da medula óssea (Estey, 2013; Dohner *et al.*, 2017; Kulsoom *et al.*, 2017).

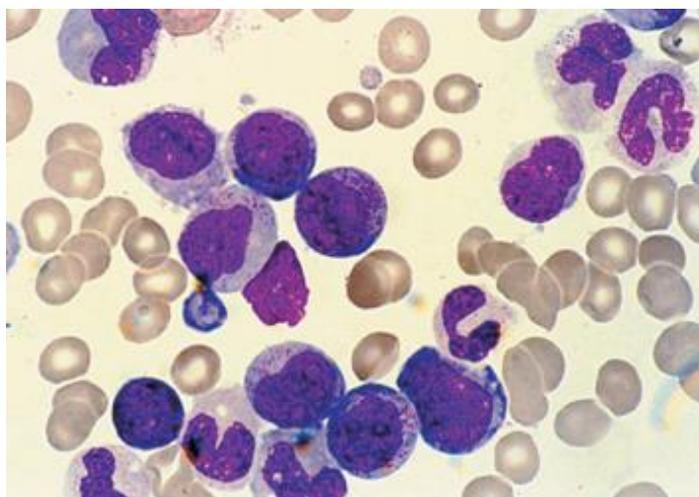


Figura 1. Esfregaço de medula óssea de um paciente com leucemia mielóide aguda ao diagnóstico. Rueda *et al.* (2004)

A LMA é responsável pelo maior número de mortes anuais por leucemias nos Estados Unidos, com uma estimativa de que, em 2020, 19.940 pessoas serão diagnosticadas com LMA e 11.180 pacientes morrerão da doença (Siegel *et al.* 2020). De acordo com o governo do Canadá, em 2019, 6.700 pessoas foram

diagnosticadas com LMA e dessas, 3.000 vieram a óbito em decorrência da doença (Canadian Cancer Statistics, 2019). O SEER – Cancer Statistics Review – diz que a mediana de idade ao diagnóstico é de 68 anos (NCI, 2020); outros registros relatam 71 anos (Juliusson, 2011), com 58,9% dos pacientes diagnosticados com 65 anos ou mais (NCI, 2020). Assim, conforme a população envelhece, pode aumentar a incidência da doença (Tallman *et al.*, 2019).

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) estimou uma incidência anual de 4,3 casos de LMA para cada 100.000 habitantes, o que a torna uma doença relativamente rara. Entretanto, ela é estudada por ser uma doença de curso rápido e de alta mortalidade. Esse mesmo instituto estimou uma sobrevida global em cinco anos de 28,7% para pacientes americanos acompanhados entre 2010 e 2016 (NCI, 2020).

No Brasil, a incidência de LMA é desconhecida, uma vez que o Instituto Nacional do Câncer (INCA) relata apenas dados referentes às leucemias em geral. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres para o ano de 2020 (INCA, 2020). 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). Outro estudo feito no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, em 2017, determinou que das leucemias agudas diagnosticadas no período de 2011 a 2015, 80,9% eram LMA (Righes *et al.*, 2017).

Apesar de não se conhecer inteiramente a causa da LMA, estudos epidemiológicos sugerem que fatores genéticos, ambientais e ocupacionais estejam envolvidos nesse mecanismo (Belson *et al.*, 2007; INCA, 2012).

2.2 FISIOPATOGENIA DA LMA

Todas as células pluripotentes da MO proliferam e se comprometem com duas linhagens celulares principais: as células mieloides (granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e monócitos) e as células linfoides (linfócitos B e T). As células mieloides se diferenciam em suas células maduras na MO, enquanto os precursores linfóides migram para os órgãos linfóides (linfonodos, baço e timo) para completar sua maturação (Ogawa *et al.*, 1993).

A leucemia aguda resulta de uma série de eventos mutacionais que ocorrem durante o complexo processo de divisão e maturação celular, conhecido como hematopoese (Figura 2). Essas múltiplas mutações genéticas permitem proliferação descontrolada e maturação anormal, então a multiplicação preferencial de células leucêmicas leva à diminuição da produção de células normais (Liesveld, 2012). As mutações podem levar à anormalidade em qualquer etapa do processo de maturação celular, razão pela qual a leucemia, especialmente o tipo mieloide, é uma doença tão heterogênea. Nesse sentido, a evolução clonal é responsável por determinar o crescimento e multiplicação acelerada de células leucêmicas, então o ponto comum de todas as formas de leucemia é que todas as células leucêmicas do corpo derivam de uma única célula progenitora anormal (Appelbaum *et al.*, 2014; Rose-Inman e Kuehl, 2014).

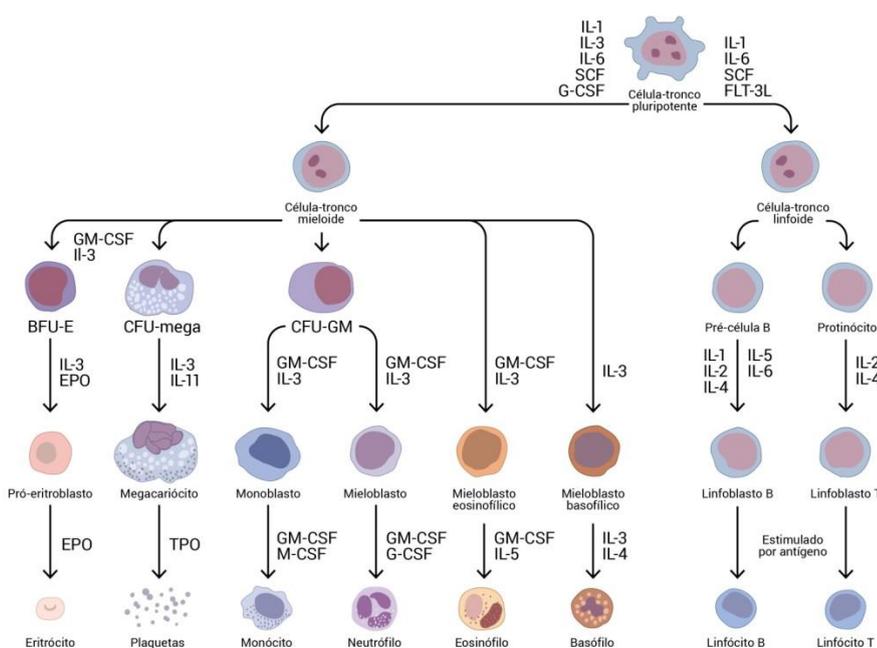


Figura 2. Fluxograma da hematopoiese, da célula-tronco hematopoiética até as células maduras. Adaptado de Seldin e Sloan (2015)

A leucemogênese pode estar associada ao acúmulo dessas modificações genéticas, além de mudanças no perfil de expressão gênica e na regulação epigenética (Sanders *et al.*, 2013). Fatores extrínsecos também podem desencadear tais alterações, como exposição a radiações ionizantes, radiações não ionizantes, inseticidas organofosforados, entre outros agentes mielotóxicos e cancerígenos, conferindo ao clone leucêmico vantagem proliferativa e perda da

capacidade de resposta a sinais de diferenciação e morte celular (Conway O'Brien *et al.*, 2014).

O aparecimento de proteínas de fusão oncogênicas geradas a partir de translocações cromossômicas específicas é um componente essencial para compreender a patogenia da LMA (Look, 1997; Alcalay *et al.*, 2001). Mais de 300 translocações e / ou inversões cromossômicas foram descritas e estão envolvidas na fisiopatogenia dessa doença, como $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13.1q22)$, $t(15;17)(q22;q21)$, translocações envolvendo 11q23 e $inv(3)(q21q26)$ (Velloso *et al.*, 2011).

Translocações cromossômicas na LMA, como a $t(15;17)(q22;q21)$ (Figura 3) dão origem a genes quiméricos no local das quebras cromossômicas, com isso, os éxons dos genes envolvidos se tornam justapostos e formam um único gene quimérico, que dá origem a uma nova proteína híbrida com características únicas. Os alvos mais frequentes desses eventos na LMA são genes que codificam fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento hematopoético normal, que, depois da recombinação, dão origem a genes híbridos que codificam proteínas de fusão com funções aberrantes, resultando em perda da função e bloqueio da diferenciação (Alcalay *et al.*, 2001).

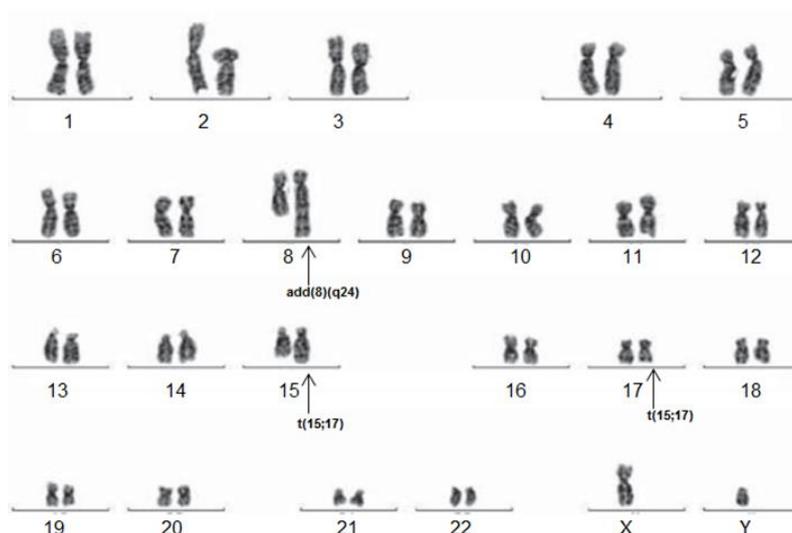


Figura 3. Paciente com leucemia miélóide aguda apresentando o cariótipo $46,XY,add(8)(q24),t(15;17)(q22;q21)$. Adaptado de Sagrillo *et al.* (2005).

Os genes envolvidos nas translocações da LMA codificam proteínas que são muito mais heterogêneas em termos de função. A contribuição desses genes

para o potencial leucemogênico das proteínas de fusão ainda não é tão claro. Entretanto, sua presença parece ser fundamental para, ao menos, alguns dos efeitos biológicos dessas proteínas, com muitos deles apresentando funções fisiológicas associadas com a regulação do ciclo celular e de apoptose (Look, 1997; Alcalay *et al.*, 2001).

Estudos *in vivo* empregando modelos de animais transgênicos revelou um mecanismo molecular comum a estas proteínas de fusão: a desregulação da transcrição gênica através do recrutamento de fatores co-ativadores ou co-repressores. A partir desses estudos observou-se a existência de uma longa fase pré-leucêmica, sugerindo que embora necessária, a expressão das proteínas de fusão apenas não é suficiente para o desenvolvimento da leucemia e que outros eventos mutagênicos devam ocorrer para o seu desenvolvimento (Wang *et al.*, 1996; He *et al.*, 1999; Rego, 2002).

Esses eventos oncogênicos são frequentemente classificados de acordo como modelo “two-hit” proposto por Gilliland (2001), que diz que dois tipos diferentes de mutações genéticas eram necessárias para a transformação maligna de um precursor mielóide (Figura 4): mutações de classe I, que ativam vias de transdução de sinal e conferem vantagem proliferativa às células hematopoiéticas, e mutações de classe II, que afetam fatores de transcrição e primariamente impedem a diferenciação hematopoiética.

Mutações que afetam os genes *FLT3*, *KIT* e os da família *RAS* são consideradas mutações de classe I, enquanto que alterações cromossômicas como t(8;21), inv(16) e t(15;17), que geram, respectivamente, os rearranjos gênicos *RUNX1/RUNX1T1* (também denominado *AML1/ETO*), *CBFB/MYH11* e *PML/RARA*, juntamente com as mutações nos genes *RUNX1*, *CEBPA* e *MLL* são consideradas dentro da classe II. Neste modelo, existem duas grandes classes de mutações associadas à leucemia aguda. De acordo com esse modelo, o acúmulo de mutações de classe I e II culminaria no desenvolvimento de progenitores hematopoéticos transformados, capazes de propagar o fenótipo leucêmico (Gilliland, 2001; Lagunas-Rangel *et al.*, 2018).

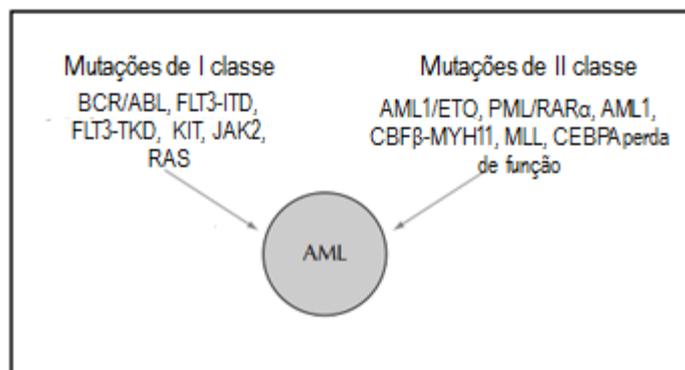


Figura 4. Esquema do modelo "two-hit" proposto por Gilliland. Adaptado de Gilliland (2001).

Estudos utilizando tecnologias de sequenciamento identificaram outro grupo de mutações que não obedecem a nenhuma das duas classes, sugerindo que as mutações de classe I e II são apenas uma parte de um quadro mais complexo e, portanto, o modelo "two-hit" não é mais adequado. Esse grupo não foi classificado, mas destaca-se por promover principalmente modificações epigenéticas no genoma da LMA (Abdel-Wahab *et al.*, 2009; Ley *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012; Conway O'Brien *et al.*, 2014).

2.3 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA LMA

A avaliação e o trabalho inicial para suspeita de LMA consistem em uma história clínica abrangente e exame físico. As avaliações laboratoriais incluem um vasto painel metabólico, um hemograma e um mielograma (Yamauchi *et al.*, 2013; Kansal, 2016). Biópsia de medula óssea, imunofenotipagem, citoquímica e análises citogenéticas (bandeamento G e hibridização *in situ* por fluorescência - FISH) são necessárias para a estratificação do risco e para orientar a terapia da LMA (Quadro 1) (Tallman *et al.*, 2019).

Diagnóstico da LMA

Histórico do paciente

Exame físico

Painel metabólico

Hemograma

Mielograma

Prognóstico da LMA

Biópsia da MO
Imunofenotipagem
Citoquímica
Citogenética

Quadro 5. Ferramentas de diagnóstico e prognóstico da leucemia mielóide aguda. Adaptado de Tallman *et al.* (2019)

O diagnóstico da LMA é feito a partir da observação do quadro clínico agudo, que se caracteriza por anemia, sangramento, geralmente do tipo purpúrico devido à plaquetopenia, e às vezes febre sem foco infeccioso, devido à neutropenia. A infiltração leucêmica em órgãos pode ocorrer, geralmente causando hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia de gengivas e dor óssea e, menos frequentemente, infiltração de pele e comprometimento do sistema nervoso central. No hemograma é frequente encontrar anemia, plaquetopenia, neutropenia e presença de mieloblastos (Bullinger e Armstrong 2010; Estey, 2012).

De acordo com a classificação da OMS de 2016, o diagnóstico de LMA é feito com base na presença de 20% de blastos na medula ou no sangue periférico. Em um ambiente clínico apropriado, um diagnóstico de LMA pode ser feito com menos de 20% de blastos em pacientes com anormalidades citogenéticas recorrentes, incluindo t(15;17), t(8;21), t(16;16), ou inv(16) ou o transcrito correspondente (Tallman *et al.*, 2019). A classificação precisa da LMA requer estudos diagnósticos multidisciplinares utilizando imunohistoquímica e citoquímica, além da análise genética molecular (Vardiman *et al.*, 2009; Kansal, 2016; Tallman *et al.*, 2019).

Várias mutações genéticas, incluindo *KIT* (4q12), *FLT3-ITD* (13q12.2), *FLT3-TKD*, *NPM1* (5q35.1), *CEBPA* (19q13.11), *IDH1*(2q34) / *IDH2* (15q26.1), *RUNX1*(21q22.12), *ASXL1* (20q11.21) e *TP53* (17p13.1), estão associadas a prognósticos específicos em um subconjunto de pacientes e podem guiar as decisões de tratamento (Ley *et al.*, 2013; Papaemmanuil *et al.*, 2016; Dohner *et al.*, 2017). Todos os pacientes devem ser testados quanto a mutações nestes genes, e painéis genéticos multiplex e análise de sequenciamento de nova geração podem ser obtidos para desenvolver uma avaliação prognóstica mais abrangente (Dohner *et al.*, 2017; Tallman *et al.*, 2019).

A LMA representa um grupo heterogêneo de leucemias que diferem quanto à sua biologia, curso clínico e prognóstico, o que tem motivado o estabelecimento de uma classificação prognóstica (Heerema-Mckenney e Arber, 2009; Bullinger e Armstrong, 2010). Dois sistemas de classificação para a caracterização dos subtipos de leucemia mieloide aguda foram criados: o Sistema Franco-Americano-Britânico (FAB), que distingue morfologicamente as leucemias por tipo de célula progenitora e maturação celular, baseado estritamente nos aspectos morfológicos e citoquímicos do clone leucêmico; e o sistema da OMS, que distingue as leucemias por suas anormalidades citogenéticas ou genéticas características (Bennett *et al.*, 1976; Saultz e Garzon, 2016). Essa classificação foi revisada em 1985 pela FAB, dando origem a uma classificação que passou a incluir dois novos subtipos, M0 e M7, aos seis subtipos existentes, cujo diagnóstico passou a incluir o uso de marcadores imunofenotípicos (Bennett *et al.*, 1985; 1991).

A classificação FAB forneceu uma terminologia comum útil, mas foi limitada em significado biológico, prognóstico e terapêutico, sendo então substituído, logo após as descobertas citogenéticas e moleculares. Então, em 2001, a OMS criou uma classificação que incorporou achados genéticos (citogenéticos e moleculares) e introduziu correlações prognósticas importantes. A classificação da OMS de 2008 expandiu o número de entidades com translocações cromossômicas recorrentes e incluiu duas entidades provisórias caracterizadas por mutações genéticas, LMA com *NPM1* mutado e LMA com mutações *CEBPA* (Arber *et al.*, 2003; Swerdlow *et al.*, 2008; Heerema-Mckenney e Arber, 2009).

Uma revisão da classificação da OMS (Quadro 2) foi feita baseada em novas perspectivas com relação a marcadores de diagnóstico e prognóstico que forneceram novas ideias para a compreensão da fisiopatologia da LMA, incluindo assim achados hematológicos, morfológicos, citogenéticos e moleculares (Arber *et al.*, 2016; Kansal, 2016). As principais mudanças na classificação de 2016 consistem na introdução de novas entidades como “LMA com *BCR-ABL1*” a fim de guiar a terapia desses pacientes com um inibidor de tirosina quinase; “LMA com mutação *RUNX1*” associada a características clinico-patológicas distintas e resultados inferiores; e além disso, LMA com *NPM1* mutado e LMA com mutações bialélicas do *CEBPA* tornaram-se entidades completas, tendo a última um desfecho favorável (Döhner *et al.*, 2017).

Leucemia mielóide 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 *NPM1* mutado

LMA com mutações bialélicas de *CEBPA*

Entidade temporária: LMA com RUNX1 mutado

LMA com mudanças relacionadas a mielodisplasia

Neoplasias mielóides 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

Quadro 6. Classificação OMS (2016) para LMA e neoplasias relacionadas. Adaptado de Arber et al. (2016).

2.4 FATORES PROGNÓSTICOS DA LMA

Os fatores prognósticos na LMA são, em geral, subdivididos entre (i) os que dizem respeito a características do paciente e suas condições gerais de saúde, e (ii) aqueles relacionados a características particulares do clone leucêmico. Os fatores do primeiro grupo – idade, *status performance* (é o método tradicional, avaliado pelo KPS e/ou ECOG, aplicado pelos hematologistas para avaliar o impacto da doença / tratamento na capacidade do paciente idoso de cuidar de si e do trabalho), saúde geral e comorbidades específicas – são particularmente relevantes na predição da mortalidade relacionada ao tratamento, como a tolerância à quimioterapia. Os fatores do segundo grupo são preditivos da resistência à terapia convencional (Juliussen, 2011; Liersch *et al.*, 2014; Strickland *et al.*, 2016; Dohner *et al.*, 2017).

Associadas aos fatores idade e *status performance*, as alterações citogenéticas e moleculares presentes ao diagnóstico são as principais variáveis relacionadas ao prognóstico na LMA (Bloomfield *et al.*, 1984; De Kouchkovsky e Abdul-Hay, 2016; Dohner *et al.*, 2017). Numerosas alterações citogenéticas recorrentes, estruturais ou numéricas, têm sido identificadas através do bandeamento G, e é possível determinar que 50 a 60% dos pacientes com LMA apresentam alterações no cariótipo. Muitas dessas alterações não são apenas marcadores diagnósticos para especificar subtipos de LMA, mas também constituem fatores prognósticos independentes para prever a remissão completa, o risco de recaída e a sobrevida global e por isso, a análise citogenética tem sido veementemente recomendada. Consequentemente, os casos de LMA podem ser estratificados em grupos de risco prognóstico favorável, intermediário ou adverso com base apenas no seu perfil citogenético (Mrózek *et al.*, 2001; Vardiman *et al.*, 2009).

O prognóstico desfavorável associado ao aumento da idade é em parte devido à sua influência sobre a chance do paciente sobreviver à terapia de indução, além do que a LMA em pacientes idosos difere biologicamente. As doenças crônicas e intercorrentes contraindicações contra tratamento citotóxico

intensivo, maior incidência de LMA secundária após síndrome mielodisplásica antecedente (SMD) ou tratamento citotóxico e maior frequência de alterações citogenéticas adversas influenciam a tolerância à terapia; problemas clínicos agudos ao diagnóstico e o *status performance* (pacientes com $\text{status} > 2$ apresentam pior prognóstico²) também influenciam, independentemente da idade, a chance de sobreviver à terapia de indução e, desse modo, responder ao tratamento (Buchner *et al.*, 2009; Krug *et al.*, 2009; Juliusson, 2011; Liersch *et al.*, 2014).

Os rearranjos cromossômicos $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13;q22)$ / $t(16;16)(p13;q22)$ ou $t(15;17)(q22;q21)$ conferem um prognóstico favorável (Mrozek *et al.*, 2001; Grimwade *et al.*, 2009; Vardiman *et al.*, 2009; Dohner *et al.*, 2010; Estey, 2014). Em contraste, alterações citogenéticas, como um cariótipo complexo (três ou mais alterações cromossômicas na ausência de qualquer alteração de prognóstico favorável), $t(1;22)(p13;q13)$, monossomia do 5 ou 7, $t(6;9)(p23;q34)$, $inv(3)(q21;q26)$ / $t(3;3)(q21;q26)$, alterações no 3q, $del(5q)$ ou alterações diferentes de $t(9;11)$ no 11q foram todas associadas a um risco adverso (Quadro 3), ou seja, um risco significativamente maior de falha e morte do tratamento (Grimwade *et al.*, 2009; Mrozek *et al.*, 2012; Dohner *et al.*, 2017).

Alteração citogenética	Produto proteico	Classificação prognóstica
$t(8;21)(q22;q22)$	<i>AML1-ETO/RUNX1-RUNX1T1</i>	Favorável
$inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22)$	<i>CBFB-MYH11</i>	Favorável
$t(15;17)(q22;q21)$	<i>PML-RARα</i>	Favorável
cariótipo complexo	variável	Desfavorável
$t(1;22)(p13;q13)$	<i>RBM15-MKL1</i>	Desfavorável
monossomia 7	variável	Desfavorável
$t(6;9)(p23;q34)$	<i>DEK-NUP214</i>	Desfavorável
$inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26)$	<i>RPN1-EVI1</i>	Desfavorável
alterações no 3q	variável	Desfavorável
monossomia do 5/ $del(5q)$	variável	Desfavorável
$t(v;11)(v;q23.3)$	rearranjo <i>KMT2A</i>	Desfavorável

Quadro 7. Discriminação dos principais rearranjos cromossômicos de prognóstico favorável e desfavorável presentes na LMA. Adaptado de Dohner *et al.* (2017)

²De acordo com a escala ECOG, pacientes são classificados entre 0-4 na escala de performance, sendo 0 completamente ativo, capaz de realizar todas as suas atividades e 4 completamente incapaz de realizar autocuidados básicos, confinado ao leito ou à cadeira (Cabral, 2011).

Os casos de LMA com risco prognóstico intermediário constituem principalmente pacientes com citogenética normal (LMA-CN), mas também pacientes com outras anormalidades estruturais ou numéricas diferentes das já citadas (Dohner *et al.*, 2010; Mrozek *et al.*, 2012). Neste último grupo, as leucemias de cariótipo normal (LMA-CN), que correspondem a 40-50% dos casos de LMA, apresentam um prognóstico incerto, devido a uma marcante heterogeneidade em relação às alterações moleculares subjacentes e responsividade ao tratamento (Grimwade *et al.*, 2010).

As alterações moleculares têm um papel particularmente importante no refinamento do prognóstico de pacientes com LMA-CN, que inclui quase metade dos casos de LMA *de novo* (Schlenk *et al.*, 2008). Assim, a LMA-CN com *CEBPA* mutado ou *NPM1* mutado na ausência de *FLT3-ITD* foi identificada como tendo um risco prognóstico semelhante ao da LMA com alterações citogenéticas favoráveis (Dohner *et al.*, 2005; 2010). Mutações no gene *FLT3-ITD* estão associadas a maior propensão de recaída e menor sobrevida global livre de doença, em grande parte devido à carga alélica do ITD, que quando baixa, representa um desfecho favorável e quando alta, um desfecho desfavorável, sendo incluídos no grupo de risco adverso (Patel *et al.*, 2012; Port *et al.*, 2014; Dohner *et al.*, 2017).

O grupo *European Leukemia Net* (ELN), em 2010, propôs uma estratificação que tinha por intenção padronizar a notificação de alterações genéticas, particularmente para correlações com características clínicas e resultados e levava em consideração o prognóstico conferido por seus cariótipos e, nos casos de LMA-CN, pelo prognóstico conferido pelas mutações *FLT3-ITD* e nos genes *CEBPA* e *NPM1* (Dohner *et al.*, 2010, Dohner *et al.*, 2017).

Em 2017, essa classificação foi revisada (Quadro 4), dividindo os pacientes em um sistema de três grupos (favorável, intermediário e adverso), substituindo o sistema anterior (favorável, intermediário I, intermediário II e adverso) e incluindo mudanças com base no status mutacional dos genes *NPM1*, *CEBPA* e *FLT3-ITD*. Quanto ao *FLT3-ITD*, deve-se levar em consideração a sua carga alélica, apresentando um desfecho favorável os pacientes com mutações *NPM1* e baixa carga alélica do *FLT3-ITD*, e um desfecho desfavorável os

pacientes com *NPM1* tipo selvagem e *FLT3-ITD* com alta carga alélica (Dohner et al., 2017).

Categoria de risco	Anormalidade Genética
Favorável	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> Inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i> baixo
Intermediário	Mutação bialélica no <i>CEBPA</i> <i>NPM1</i> mutado com <i>FLT3-ITD</i> alto <i>NPM1</i> selvagem sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i> baixo t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Anormalidades citogenéticas que não possuem risco favorável nem adverso
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> Inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -5 ou del(5q); -7; -17/abn(17p) Cariótipo complexo, cariótipo monossômico <i>NPM1</i> selvagem com <i>FLT3-ITD</i> alto Mutação no <i>RUNX1</i> Mutação no <i>ASXL1</i> Mutação no <i>TP53</i>

Quadro 8. Estratificação de risco do grupo European LeukemiaNet (ELN), relacionando as anormalidades genéticas aos grupos de risco. Adaptado de Dohner et al. (2017).

Para pacientes adultos com idade inferior a 60 anos essa categorização é primariamente utilizada para guiar o protocolo terapêutico a ser escolhido após a primeira remissão. Os pacientes de grupo de risco favorável são os que mais se beneficiam da quimioterapia convencional como terapia pós-remissão, uma vez que não tem sido observada nenhuma vantagem quando esses pacientes são

tratados com o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) autólogo ou alogeneico (Schlenk *et al.*, 2004; Yanada *et al.*, 2005; Koreth *et al.*, 2009).

Para os pacientes do grupo de risco intermediário a terapia convencional tem sido amplamente utilizada, mas para alguns pacientes foram observados resultados insatisfatórios. O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogeneico pode ser uma opção atrativa para aqueles pacientes do grupo intermediário que apresentam altas chances de recaída, em particular para os que apresentam a mutação *FTL3*-ITD (Schlenk *et al.*, 2008; Dohner *et al.*, 2010). Para os pacientes do grupo de risco adverso, é considerado que o tratamento de escolha para a terapia pós-remissão deva ser o TCTH alogeneico, uma vez que eles em nada se beneficiam com a quimioterapia convencional (Yanada *et al.*, 2005; Koreth *et al.*, 2009). Nesse contexto, é necessário entender melhor quais genes podem estar associados com os diferentes tipos de cariótipos presentes na LMA, para assim determinar de maneira mais eficaz o prognóstico do indivíduo portador da doença.

2.5 AURORA QUINASES

A ordem exata dos eventos de progressão do ciclo celular é assegurada por mecanismos de controle de *feedback* fortemente orquestrados, chamados "pontos de verificação", que impedem a progressão de fase para fase até que condições críticas específicas sejam satisfeitas (Castro-Gamero *et al.*, 2018). A mitose, responsável pela duplicação da célula-mãe em duas células-filhas, é regulada com precisão por uma série de serina / treonina-quinases no ciclo celular, como as Aurora-quinases. Essas proteínas são importantes e indispensáveis em várias etapas da progressão mitótica (Nigg, 2001).

Aurora é o nome dado a uma família de proteínas quinases serina/treonina formada por três proteínas (AURKA, AURKB e AURKC) que regulam muitos processos durante a divisão celular. As AURKs têm funções essenciais em processos mitóticos, como condensação cromossômica, dinâmica do fuso, interações cinetócoro-microtúbulos, orientação cromossômica e estabelecimento da placa metafásica. Essas proteínas também são necessárias para a conclusão adequada da citocinese (Carmena e Earnshaw, 2003, Goldenson e Crispino, 2015).

As proteínas AURKs A, B e C, que compreendem 403, 344 e 309

aminoácidos, respectivamente, são altamente conservadas e mantêm uma estrutura homóloga, constituindo um domínio N-terminal composto por 39 a 129 resíduos, um domínio de proteína quinase e um domínio C-terminal de 15 a 20 resíduos (Figura 5) (Goto *et al.*, 2002; Ouchi *et al.*, 2004; Knowlton *et al.*, 2006; Brittle *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2009; Hans *et al.*, 2009). As três AURKs são expressas diferencialmente em altos níveis em tecidos que se dividem rapidamente, como células hematopoiéticas (A e B) e células germinativas (apenas C) (Su *et al.*, 2004). Por outro lado, a expressão da AURK é baixa ou ausente na maioria dos tecidos adultos, devido às menores taxas de proliferação (Bischoff *et al.*, 1998).

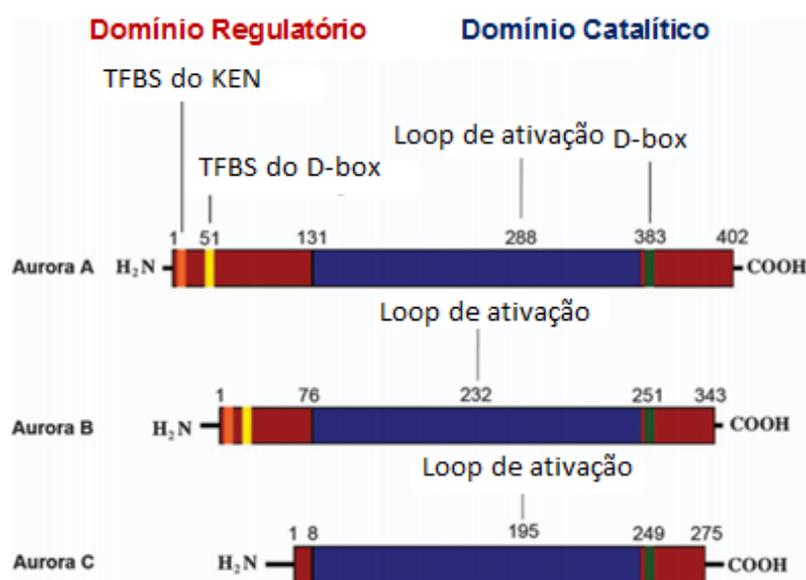


Figura 5. Estrutura e domínios das AURKs. Seus domínios N-terminal e C-terminal contém locais de ligação do fator de transcrição (do inglês *transcriptional factor binding sites* – TFBS) do D-box e do KEN enquanto o domínio central das quinases contribuem para a atividade catalítica. O domínio central também contém um TFBS essencial como o resíduo de ativação (loop de ativação). Adaptado de Goldenson e Crispino (2015).

2.5.1 Localização e funções das Aurora quinases

As proteínas da AURKA localizam-se nos centrossomos duplicados desde o início da fase S e muda para os microtúbulos do fuso bipolar durante a mitose, além de se mover para os materiais perinucleares da célula filha no final da mitose (Figura 6) (Sugimoto *et al.*, 2002). Por outro lado, a proteína AURKB aparece no início da G2 e localiza-se nos cromossomos da prófase, no centrômero na prometáfase e na metáfase, no eixo central na anáfase e no meio do corpo na citocinese (Kovarikova *et al.*, 2016). Um estudo identificou que a proteína AURKC se localiza no centrossomo na interfase e se liga ao

cromossomo durante a mitose (Uehara *et al.*, 2013). No entanto, o deslocamento exato da distribuição do AURKC durante a mitose ainda não está estabelecido (Tang *et al.*, 2017).

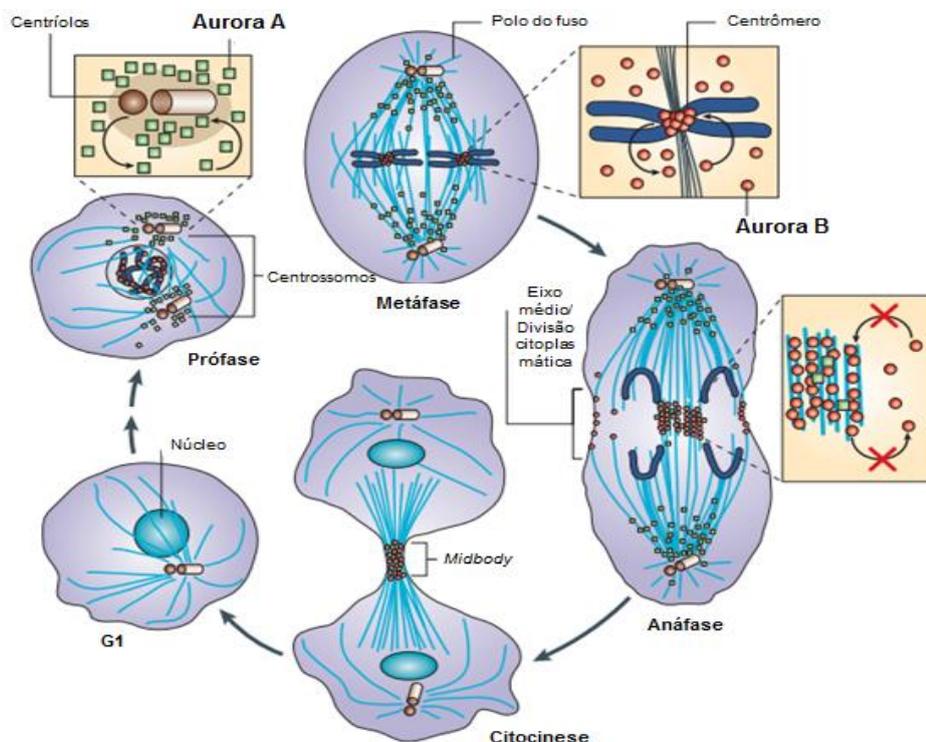


Figura 6. Deslocamento da localização celular de Aurora quinases na mitose (AURKC não é mostrado devido à localização e função celular incerta). Adaptado de Carmena e Earnshaw (2003).

Embora todas as três AURKs estejam envolvidas na divisão celular, as funções específicas de cada quinase variam (Quadro 5) (Tang *et al.*, 2017). AURKA regula a maturação e separação dos centrosomos e a montagem do fuso (Vagnarelli e Earnshaw, 2004). AURKA regula a progressão da mitose fosforilando múltiplos substratos e promove a entrada na mitose controlando a ativação da Ciclina-B/Cdk-1. (Marumoto *et al.*, 2003; Stenoiien *et al.*, 2003; Krystynial *et al.*, 2006). A AURKA também ativa a quinase-1 polo-like (Plk-1) em G2 devido à fosforilação da mesma. Ligando a AURKA a TPX2 causa uma ativa conformação e previne a desfosforilação de Thr288 na AURKA pela proteína fosfatase 1 (Bayliss *et al.*, 2003). A PLK-1, que também está envolvida na maturação do centrosomo, direciona a AURKA para os centrosomos (Petretti *et al.*, 2006). Outras interações funcionais importantes incluem a fosforilação de LATS2, NDE11 e TACC3 por AURKA para o recrutamento e maturação dos centrosomos (Toji *et al.*, 2002; Muri *et al.*, 2007).

A AURKB controla a citocinese e a biorientação cromossômica como membro do CPC (*chromosome passenger complex*), forma um complexo com duas outras proteínas, a proteína do centrômero interno e a survivina, e se comportam como proteínas cromossômicas 'passageiras'. Esse complexo localiza-se nos cinetócoros e centrômeros da prófase à metáfase e depois se muda para o sulco de clivagem e o corpo médio durante a citocinese (Earnshaw e Bernat, 1990; Adams *et al.*, 2000; Terada, 2001; Vagnarelli e Earnshaw, 2004). A AURKB é essencial para uma citocinesia adequada; na sua ausência, as duas células filhas permanecem ligadas umas às outras por pontes de citoplasma, os cromossomos se desregulam e as células filhas binucleadas formam-se (Honda *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007).

A AURKC coordena os fusos meióticos na espermatogênese, enquanto também coopera com a AURKB para regular a dinâmica cromossômica mitótica. São expressas especificamente em níveis elevados no testículo (Hu *et al.*, 2000). Mutações em AURKC demonstraram causar infertilidade em humanos; porém, esses indivíduos não apresentam outro fenótipo óbvio, apoiando a ideia de que a AURKC não é necessário em células somáticas (Dieterich *et al.*, 2007).

Aurora Quinase	Funções
AURKA	Entrada na mitose Nucleação dos microtúbulos Maturação/Separação do centrômero Montagem do fuso Citocinese Saída da mitose
AURKB	Condensação dos cromossomos Alinhamento cromossômico Segregação cromossômica Ligação microtúbulo-cinetócoro Citocinese
AURKC	Segregação cromossômica na meiose

Quadro 9. Funções das Auroras quinases. Adaptado de Tang *et al.* (2017).

2.5.2 Aurora quinases no câncer

Os genes *AURKA*, *B* e *C* são mapeados em regiões cromossômicas

instáveis de 20q13.2, 17p13.1 e 19q13 (Figura 7), respectivamente, com frequentes deserções, ampliações e mutações, dando uma boa explicação da expressão anormal de Aurora quinases em cânceres humanos (Tang *et al.*, 2017). *AURKA* é frequentemente associado a cânceres, *AURKB* contribui para a tumorigênese, mas o papel do *AURKC* ainda não está devidamente associado (Dar *et al.*, 2010). Os níveis de expressão de *AURKA* e *AURKB* humanas e alguns dos seus polipeptídeos associados são elevados em certos tipos de câncer (câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer gástrico/gastrointestinal, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão) e está associado ao mau prognóstico. Assim, esses genes tornam-se alvos terapêuticos promissores para o tratamento de neoplasias malignas. (Carmena e Ernshaw, 2003; Carvajal *et al.*, 2006; Takeshita *et al.*, 2013; Pitts *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2019).

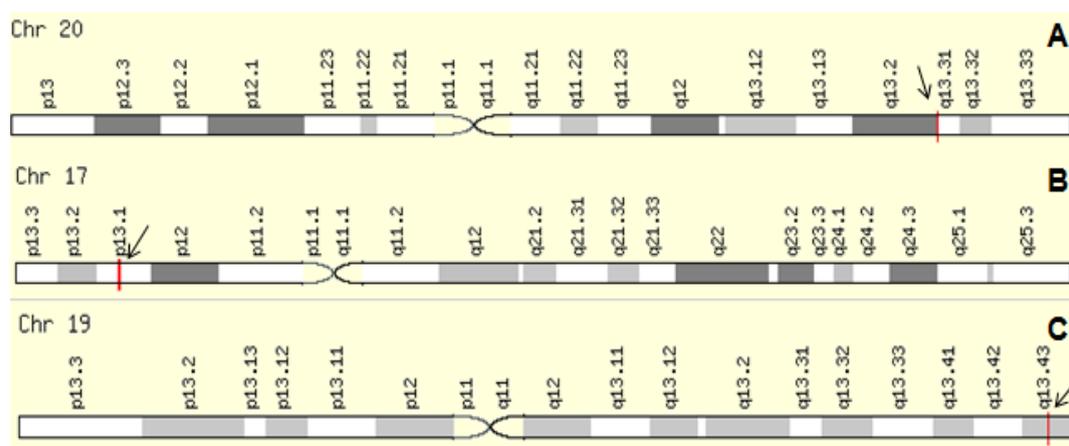


Figura 7. Localização cromossômica dos genes da família AURK: (A) *AURKA* no 20q13.2, (B) *AURKB* no 17p13.1 e (C) *AURKC* no 19q13. Adaptado de NCBI (2019).

Quando *AURKA* está hiperexpressa, a montagem do fuso mitótico ocorre de maneira defeituosa e mesmo assim as células entram em anáfase. A mitose é então interrompida como resultado da falha na conclusão da citocinese, com subsequente multinucleação (Anand *et al.*, 2003). Estudos anteriores *in vitro* e *in vivo* indicaram que a superexpressão de *AURKA* contribui para a instabilidade do genoma e a tumorigênese, onde *AURKA* frequentemente tem uma expressão aumentada em cânceres humanos, incluindo leucemias e câncer de mama, próstata e cólon (Toughiri *et al.*, 2013; Casorzo *et al.*, 2015. Cirak *et al.*, 2015). Além disso, níveis aumentados de *AURKA* estão correlacionados com estados

clínicos avançados, menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global em indivíduos com câncer colorretal (Goos *et al.*, 2013).

Além da aneuploidia resultante da superexpressão de *AURKB* nas neoplasias, também ocorre a promoção do ciclo celular via inibição ou aprimoramento de alvos relacionados ao ciclo celular. *AURKB* diminui a expressão do inibidor do ciclo celular p21WAF1/CIP1 através da supressão da atividade da TP53 (González-Loyola *et al.*, 2015) resultando na ativação aberrante da quinase 1 dependente de ciclina (Cdk1), levando à progressão do ciclo celular e, assim, promovendo a sobrevivência celular. Além disso, o Cdk1 ativa a acetiltransferase TIP60, causando acetilação e ativação do *AURKB*, o que contribui ainda mais para a aneuploidia anormal e a progressão descontrolada do ciclo celular (Tang *et al.*, 2017).

A *AURKC* pode promover o desenvolvimento de tumores em vista da sobreposição e função complementar da *AURKB*, bem como a amplificação e superexpressão de genes em cânceres (Zekri *et al.*, 2012), embora o mecanismo ainda seja discutido (Dar *et al.*, 2010). Os genes *AURKA* e *AURKB* foram propostos como alvos de terapia anticâncer, e estudos pré-clínicos demonstraram que medicamentos direcionados a eles podem induzir a parada do crescimento nas linhagens celulares e inibir o crescimento de tumores em estudos de xenoenxerto (Gaustschi *et al.*, 2008; Mountzios *et al.*, 2008; Keen e Taylor, 2009).

2.5.3 Papel das AURKs na leucemia mielóide aguda

AURKA e *AURKB* são altamente expressas em muitas malignidades, incluindo vários tipos de leucemia e estão associadas a altas taxas de proliferação, mau prognóstico e resistência terapêutica (Lucena-Araújo *et al.*, 2011). *AURKA* fosforila TP53, comprometendo sua atividade supressora de tumor. A alta expressão de *AURKA* e *AURKB* em combinação com a mutação TP53 pode induzir transformação ou causar tumores mais agressivos (Gautschi *et al.*, 2008; Portella *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Cirak *et al.*, 2015; Goldenson e Crispino, 2015; Mignogma *et al.*, 2016).

Estudos examinaram a expressão dos genes *AURKs* na LMA e descobriram que blastos expressam de forma aumentada *AURKA* e *AURKB* em comparação com as células CD34+ de controle. Essa alta expressão está associada a alterações citogenéticas desfavoráveis e outros fatores adversos,

como uma contagem alta de glóbulos brancos (Ye *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013). Um estudo de Yang *et al.* (2013) demonstrou que o bloqueio de *AURKA* usando um inibidor de AURK chamado MLN8237 reduz a capacidade de auto-renovação e elimina a população CD34+/CD38- de células LMA em associação com a regulação positiva da expressão de p53 *in vivo*. A expressão aumentada de *AURKA* afeta mais significativamente a proliferação e diferenciação de células tronco/progenitoras hematopoiéticas CD34+ do que a alta expressão de *AURKB*, sugerindo que o *AURKA* é um estimulador mais potente da proliferação de células-tronco cancerígenas que o *AURKB* (Cammareri *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016).

A LMA é uma das neoplasias hematológicas mais difíceis de curar (Gaidzik e Dohner, 2008; Marcucci *et al.*, 2011). A atual terapia padrão para LMA é baseada em esquemas quimioterapêuticos antigos, que deixam margem para melhorias consideráveis. Muitos médicos consideram os genes *AURKs* como bons alvos terapêuticos para a LMA, o que é apoiado por evidências clínicas. Os inibidores de AURK, incluindo AT9282, MLN-8237 e KW-2449, foram avaliados em ensaios clínicos por sua eficácia no tratamento da leucemia, onde mostraram atividade promissora na LMA (Moore *et al.*, 2011). Além disso, avanços no desenvolvimento de inibidores de AURK como terapia para neoplasias hematológicas atraiu considerável atenção (Moore *et al.*, 2010; Farag, 2011; Chaudary *et al.*, 2015; Heo *et al.*, 2019).

2.6 BANCOS DE DADOS

2.6.1 The Cancer Genome Atlas (TCGA)

O banco de dados TCGA pertence a um projeto público financiado que buscou catalogar e descobrir as maiores alterações no genoma que causam câncer, em grandes coortes de mais de 30 tipos de cânceres humanos. Através de técnicas como sequenciamento de genoma em larga escala e análises integradas multidimensionais, foi possível construir esse banco (Tomczak *et al.*, 2015). Composto por 200 pacientes adultos com LMA *de novo* provenientes dos EUA, o TCGA inclui o sequenciamento de RNA (RNA-seq) (Cancer Genomic Atlas Research Network *et al.*, 2013).

Os pesquisadores do TCGA identificaram novas alterações genômicas subjacentes ao desenvolvimento da LMA. O panorama de genes mutados

mostrou que a LMA apresenta o menor nível de mutação entre outros tipos de neoplasias em adultos. A média de genes mutados é de 13 mutações por caso, das quais cinco foram mutadas de forma recorrente, indicando potencial alvo terapêutico. (Cancer Genomic Atlas Research Network *et al.*, 2013).

2.6.2 Beat-AML

Nesse banco de dados, uma coorte de amostras de pacientes com LMA é apresentada, com informações clínicas detalhadas, análises genômicas e transcriptômicas, e estudos de sensibilidade à drogas *ex vivo*. Novas informações sobre a biologia e o potencial translacional em relação à LMA foram descobertas e a integração desse banco de dados tem revelado novos marcadores e mecanismos de sensibilidade e resistência à drogas que pedem mais estudos. No *Beat AML* está incluído o sequenciamento do RNA (RNA-Seq) e um painel de drogas *ex vivo* (usando 122 inibidores de pequenas moléculas) em 672 amostras de tumor de 562 patients (275 de novo) (Tyner *et al.*, 2018).

2.6.3 Genetics Selection Evolution (GSE)

O banco de dados GSE é composto por 461 pacientes com LMA e foi criado para validar o perfil de expressão gênica como o método de preferência para prever o prognóstico de relevantes subtipos de LMA. Esse banco utilizou o método de microarray para determinar a expressão dos genes (Verhaak *et al.*, 2009).

2.6.4 Banco de células Bloodspot

O BloodSpot é um banco de dados de células hematopoiéticas saudáveis e doentes. O banco de dados e a interface foram construídos com o objetivo de fornecer acesso rápido para testes e geração de hipóteses, através da pesquisa de expressão de mRNA de diferentes genes durante o curso da hematopoiese, bem como em blastos leucêmicos. Esse banco de dados utilizou o sequenciamento por FACS (do inglês, *Fluorescence-activated Cell Sorting*) de células altamente purificadas e o RNA-seq de célula única, para visualizar rapidamente a expressão de genes ou assinaturas nas células hematopoiéticas (Bagger *et al.*, 2018).

Dessa forma, devido à heterogeneidade da LMA, o papel do cariótipo em

determinar o prognóstico da doença e a participação dos *genes AURKA, AURKB* e *AURKC* no ciclo celular, hipotetizamos que esses genes possuem um papel na instabilidade cromossômica vista na LMA, particularmente associados com o cariótipo complexo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DE ESTUDO E SELEÇÃO DE PACIENTES

O projeto foi desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN-UFPE) e no LAVITE do Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz-PE, que ofereceram toda a infraestrutura requerida para a pesquisa. A Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) e o Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) foram incluídos no projeto como instituições co-participantes, onde foram coletadas as amostras e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes.

Na primeira coorte (Recife), foram incluídos 69 pacientes adultos com LMA diagnosticados de janeiro de 2010 a março de 2020. Esses pacientes foram diagnosticados e acompanhados no Hemope e no HCP seguindo os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Jaffe *et al.*, 2001). O seguimento dos pacientes foi censurado / atualizado em março de 2020 e para aqueles em que o seguimento foi perdido foram censurados na última data em que sabidamente estavam vivos.

As demais coortes foram compostas por pacientes com LMA, excluindo leucemia promielocítica aguda (LPA), que apresentavam dados clínicos, dados de citogenética e expressão gênica de *AURKA*, *AURKB* e *AURKC*. A segunda coorte, denominada TCGA (The Cancer Genome Atlas) foi composta por 155 pacientes e pode ser acessada no www.cbioportal.org (Cancer Genomic Atlas Research Network *et al.*, 2013). A terceira coorte, chamada de Beat-AML, foi composta 326 pacientes e pode ser acessada pelo www.cbioportal.org (Tyner *et al.*, 2018). A quarta coorte, chamada de GSE, foi composta por 420 pacientes e está disponível no www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE6891 (Verhaak *et al.*, 2009).

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CCS/UFPE) (Nº do parecer: 3.135.311) – Anexo I (Parecer 1), Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer de Pernambuco (SPCC) (Nº do parecer: 3.337.819) – Anexo I (Parecer 2) e do

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Hemope) (Nº do parecer: 3.402.769) – Anexo I (Parecer 3). Após a aprovação, o projeto foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta da pesquisa e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Anexo II, concedendo autorização para a coleta da amostra de sangue periférico e/ou medula óssea para a realização de procedimentos posteriores.

Para a coorte Recife, pacientes sem todos os dados clínico-laboratoriais necessários para este estudo (idade, gênero, citogenética) ou por motivo de transferência para outras unidades de saúde que não estiveram envolvidas no estudo foram excluídos.

As demais coortes foram compostas por pacientes com LMA, excluindo leucemia promielocítica aguda (LPA – t(15;17)), que apresentaram dados clínicos, dados de citogenética e expressão gênica de *AURKA*, *AURKB* e *AURKC*.

3.3 COLETA DE MATERIAL

Para as análises moleculares dos pacientes com LMA, foram utilizadas amostras de 5 mL de medula óssea (MO) e / ou 4 mL de sangue periférico (SP), desde que este último tenha apresentado mais de 80% de blastos leucêmicos circulantes. Para as análises citogenéticas desses pacientes, foram utilizadas apenas amostras de MO. Essas amostras foram coletadas no momento do diagnóstico e somente o material excedente foi utilizado na pesquisa, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexo II).

As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório de Hematologia e Biologia Molecular do LABCEN-UFPE, onde foram processadas para que as análises moleculares pudessem ser realizadas.

3.4 ANÁLISE CITOGENÉTICA

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de medula óssea, onde foram adicionados 4 mL de meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado com 1 mL de soro bovino fetal (20%), colchicina (SIGMA) na concentração de 0,05µg / ml e $0,5 \times 10^6$ células / ml de medula óssea

em 05 (cinco) tubos cônicos de 15 mL. Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37 °C, por cerca de 18 horas (*overnight*). Ao completar as horas de cultivo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1600 rpm, o sobrenadante desprezado e foi realizado o choque hipotônico adicionando 6 ml de cloreto de potássio (KCl) previamente aquecido a 37 °C. Em seguida os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 20 minutos. Ao término, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 1600 rpm, o sobrenadante foi retirado e adicionado o fixador metanol:ácido acético (3:1) até completar 6 ml. Para a preparação das lâminas, foram realizadas centrifugações e trocas de fixador até que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

Após o processo de fixação as lâminas foram confeccionadas a partir do precipitado de células ressuspenso em 0,5 – 1,0 ml de solução fixadora. O precipitado de células ressuspenso foi gotejado em dois pontos em cada lâmina e essas foram colocadas para secar a temperatura ambiente durante 24 h. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 2 % (Merck) diluído em tampão fosfato (pH 6.8) durante 6 minutos, para verificação do índice mitótico e qualidade das metáfases, bem como para uma possível análise e documentação. O bandeamento G foi realizado segundo Seabright (1971), com modificações. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016). A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico Zeiss. Para cada paciente foram analisadas pelo menos 20 metáfases e foi considerado anormal quando a alteração cromossômica apareceu em no mínimo 20 metáfases.

3.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para as análises moleculares, a extração do material genético (RNA total) foi realizada a partir dos leucócitos de pacientes com LMA, seguindo a técnica do Trizol[®] (Invitrogen, USA), o qual consiste numa solução monofásica à base de fenol e isotiocianato de guanidina, que deriva de uma modificação do método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987).

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (AppliedBiosystems, EUA). As reações ocorreram em volumes de 15 µl, contendo um micrograma de RNA total, 2.5 µl de 10x RT Buffer, 1 µl de 25x dNTP mixture, 2.5 µl 10x Random Primers, 1.25 µl de

MultiScribe RT (50U/μl) e H₂O deionizada tratada com DEPC 0,1% (SIGMA, EUA) suficiente para completar o volume final. As reações ocorreram durante 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 segundos a 85°C. Após a síntese do DNA complementar (cDNA), os níveis de expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* foram determinados pela técnica de RT-qPCR (do inglês, *Real-Time Quantitative PCR*), utilizando o equipamento *QuantStudio 5 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) e a metodologia *TaqMan*[®] (Assay ID *AURKA*: Hs01582072_m1; Assay ID *AURKB*: Hs00177782_m1; Assay ID *AURKC*: Hs00152930_m1).

As reações foram preparadas em um volume final de 10 μL, utilizando 5 μL de Taqman Expression Master Mix (Thermofisher, Foster City, EUA), 0,5 μL de sonda Taqman na concentração de 20 vezes (Thermofisher, Foster City, EUA), 2,5 μL de H₂O ultrapura e 2 μL de cDNA na concentração de 10 ng/μL. A ciclagem para os ensaios foi 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Neste método, o número de cópias amplificadas de um dado gene é proporcional à fluorescência quantificada pelo aparelho, oriunda da liberação e ativação de um fluorocromo ligado a uma sonda específica para o gene de interesse. Os resultados dessa foram gerados de forma relativa à média geométrica dos genes constitutivos *beta-actina* e gliceraldeído 3-phosphato desidrogenase (*GAPDH*). Os resultados foram gerados por meio do método comparativo do ΔC_t ($C_{t_{AURKA, AURKB \text{ ou } AURKC}} - C_{t_{\text{média geométrica dos genes constitutivos}}}$).

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar o impacto da expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* sobre características laboratoriais e citogenéticas dos pacientes com LMA, as amostras foram separadas em quartis de acordo com os níveis de expressão relativa dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC*. Quatro grupos cariótipos foram determinados: cariótipo normal, porque a maioria dos pacientes com LMA apresentem esse cariótipo; cariótipo complexo, pois a hipótese levantada está relacionada a esse tipo de cariótipo, uma vez que ele se enquadra no tipo de prognóstico mais adverso; translocações/inversões, porque são alterações, em sua maioria, estruturais e adições/deleções porque são, em sua maioria, alterações numéricas.

A análise da expressão dos genes estudados em pacientes com cariótipo normal e cariótipo alterado, independentemente de qual tipo de alteração, também foi feita, assim como a análise combinada dos três genes, porém as amostras foram divididas pela mediana. Para as diferenças entre as variáveis contínuas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste Chi-quadrado ou, quando aplicável, o teste exato de Fisher. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *SPSS Statistics* 19.0 e *STATA* versão 14.9.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS COORTES

As características laboratoriais das coortes TCGA, GSE, Beat-AML e da coorte Recife (Anexo III – Tabela suplementar) estão apresentadas na Tabela 1. A distribuição com relação ao sexo foi similar entre as coortes. Embora tenha sido possível observar uma tendência de maior frequência do sexo masculino nas coortes, esta diferença não foi significativa ($P=0,080$). Por outro lado, a mediana de idade foi significativamente maior na coorte Beat-AML ($P<0,0001$), enquanto que a coorte GSE apresentou uma menor frequência de pacientes com cariótipo complexo ($P<0,0001$).

Tabela 1. Dados laboratoriais de pacientes das coortes Recife, TCGA, Beat-AML e GSE.

	Coorte Recife (n=69)	Coorte TCGA (n=155)	Coorte BEAT-AML (n=326)	Coorte GSE (n=420)	P-valor
Sexo					
Masculino	41 (59,4%)	84 (54,2%)	195 (59,8%)	213 (50,7%)	0,080
Feminino	28 (40,6%)	71 (45,8%)	131 (40,2%)	207 (49,3%)	
Idade, mediana, em anos (intervalo)					
	53 (17-80)	59 (18-88)	62 (18-87)	44 (15-77)	< 0,0001
Citogenética					
Cariótipo complexo (CC)	12 (17,4%)	23 (14,8%)	39 (12,0%)	22 (5,2%)	
Cariótipo Normal (CN)	35 (50,7%)	82 (52,9%)	198 (60,7%)	203 (48,3%)	<0,0001
Translocações / Inversões	13 (18,8%)	23 (14,8%)	54 (16,6%)	137 (32,6%)	
Adição / Deleção	9 (13,1%)	27 (17,4%)	35 (10,7%)	58 (13,8%)	

O número de pacientes com cariótipo complexo variou, com a maior porcentagem tendo sido apresentada pela coorte TCGA. A porcentagem de pacientes com cariótipo normal representou, em todas as coortes, o grupo cariótipo com maior quantidade de indivíduos. As translocações foram o segundo grupo com maior quantidade de pacientes, com exceção da coorte TCGA.

4.2 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *AURKA*, *AURKB* E *AURKC* EM CÉLULAS LEUCÊMICAS E HEMATOPOIESE NORMAL

O banco de células BloodSpot foi utilizado para entender a expressão de

AURKA, *AURKB* e *AURKC* durante a LMA e na hematopoiese normal do indivíduo. Em células da hematopoiese normal, a expressão de *AURKA* (Figura 8) vai aumentando entre células-tronco hematopoiéticas e tem seu pico de expressão no mielócito. Na doença, *AURKA* apresenta maior expressão no cariótipo complexo e menor expressão na t(8;21).

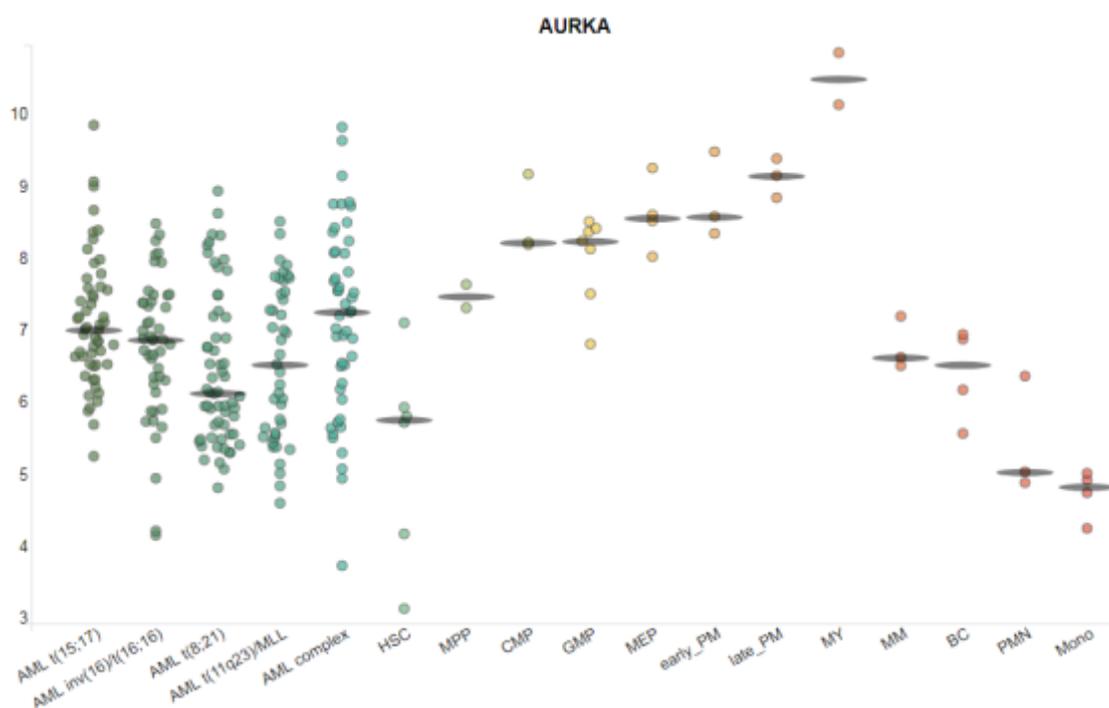


Figura 8. Expressão de *AURKA* nos diferentes tipos de células e nas translocações mais bem definidas da LMA. AML t(15;17) - t(15;17) na LMA; AML inv(16)/t(16;16) -inv(16) na LMA; AML t(8;21) - t(8;21); AML t(11q23)/MLL - t(11q23)/MLL na LMA; AML complex - LMA cariótipo complexo; HSC - células-tronco hematopoiéticas; MPP - progenitores multipotenciais; CMP - Célula progenitora mieloide comum; GMP - Progenitores granulocíticos-monocíticos; MEP - Célula progenitora Megacariocítica-eritroide; Early_PM - Promielócito imaturo; Late_PM - Promielócito maduro; MY - Mielócito; MM - Metamielócitos; BC - Bastão; PMN - Polimorfos nucleares maduros; Mono - Monócitos. Bagger *et al.* (2018).

A expressão de *AURKB* (Figura 9) em células da hematopoiese normal variou, porém seu pico de expressão também aconteceu no mielócito. Na LMA, a expressão de *AURKB* é similar entre o cariótipo complexo e a LMA t(11q23). No restante das translocações, todas de bom prognóstico, *AURKB* tem uma expressão mais baixa quando comparada às de prognóstico adverso (cariótipo complexo e t(11q23)).

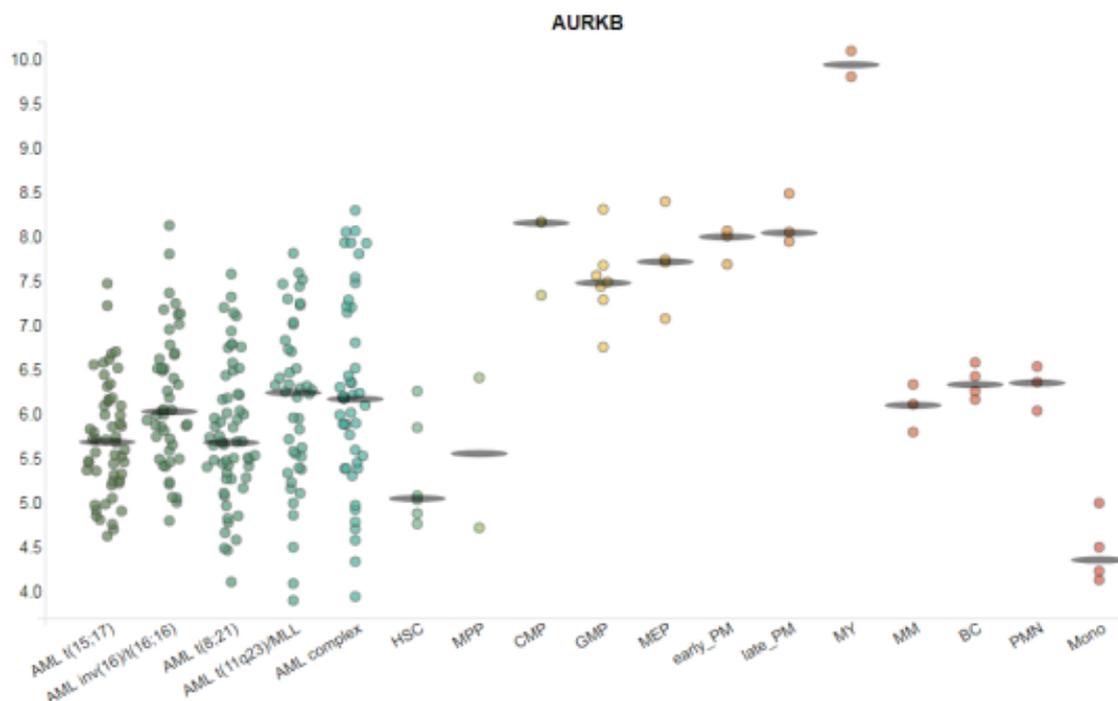


Figura 9. Expressão de *AURKB* nos diferentes tipos de células e nas translocações mais bem definidas da LMA. AML t(15;17) - t(15;17) na LMA; AML inv(16)/t(16;16) -inv(16) na LMA; AML t(8;21) - t(8;21); AML t(11q23)/MLL - t(11q23)/MLL na LMA; AML complex - LMA cariótipo complexo; HSC - células-tronco hematopoiéticas; MPP - progenitores multipotenciais; CMP - Célula progenitora mieloide comum; GMP - Progenitores granulocíticos-monocíticos; MEP - Célula progenitora Megacariocítica-eritroide; Early_PM - Promielócito imaturo; Late_PM - Promielócito maduro; MY - Mielócito; MM - Metamielócitos; BC - Bastão; PMN - Polimorfos nucleares maduros; Mono - Monócitos. Bagger *et al.* (2018).

A expressão de *AURKB* (Figura 10) em células da hematopoiese normal é homogênea entre as células mais imaturas, entretanto entre células maduras sua maior expressão aparece em polimorfos nucleares maduros. Na LMA, a expressão de *AURKB* é maior no cariótipo complexo e entre as translocações apontadas, a expressão de *AURKB* é bem similar.

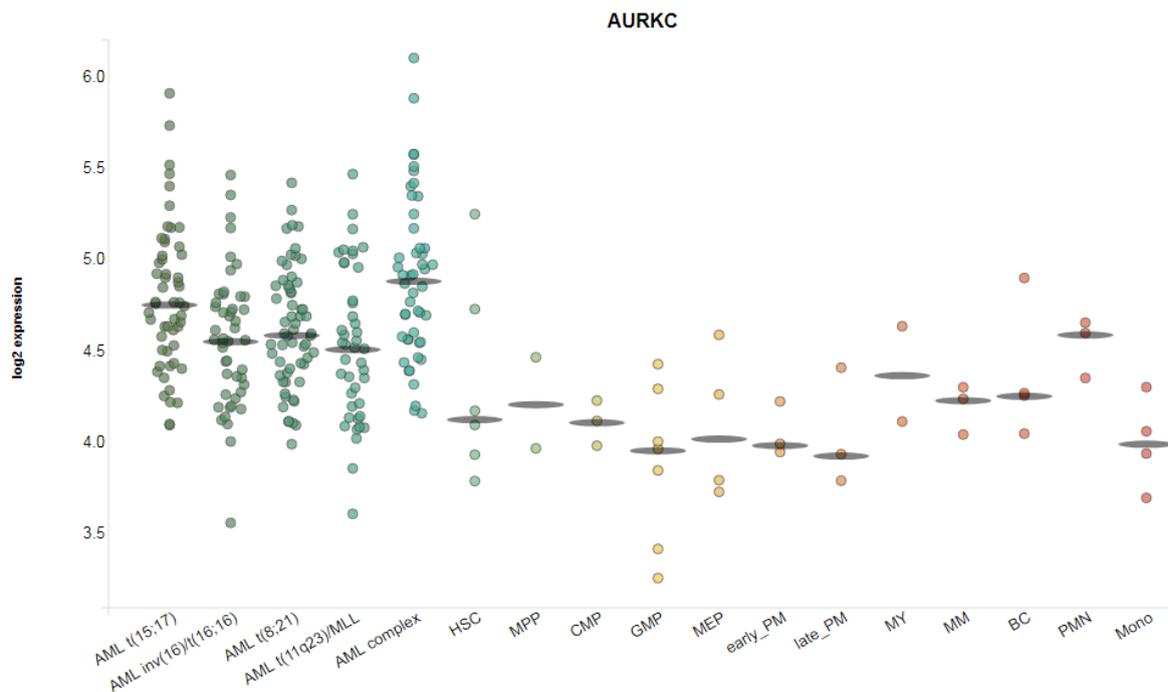


Figura 10. Expressão de *AURKC* nos diferentes tipos de células e nas translocações mais bem definidas da LMA. AML t(15;17) - t(15;17) na LMA; AML inv(16)/t(16;16) -inv(16) na LMA; AML t(8;21) - t(8;21); AML t(11q23)/MLL - t(11q23)/MLL na LMA; AML complex - LMA cariótipo complexo; HSC - células-tronco hematopoiéticas; MPP - progenitores multipotenciais; CMP - Célula progenitora mieloide comum; GMP - Progenitores granulocíticos-monocíticos; MEP - Célula progenitora Megacariocítica-eritroide; Early_PM - Promielócito imaturo; Late_PM - Promielócito maduro; MY - Mielócito; MM - Metamielócitos; BC - Bastão; PMN - Polimorfos nucleares maduros; Mono - Monócitos. Bagger *et al.* (2018).

Com essas informações, resolvemos aplicar a estratificação de pacientes da mesma forma que o BloodSpot, separando as translocações em inv(16), t(8;21), t(11q23) e cariótipo complexo. Pacientes com t(15;17) foram excluídos do estudo pois esse tipo de LMA é bem definida, com tratamento eficaz e bom prognóstico e nós buscamos entender melhor outros tipos de LMA mais heterogêneas. O grupo outros é composto de translocações diferentes das especificadas. Na coorte TCGA (Figura 11) não houve diferença estatística significativa.

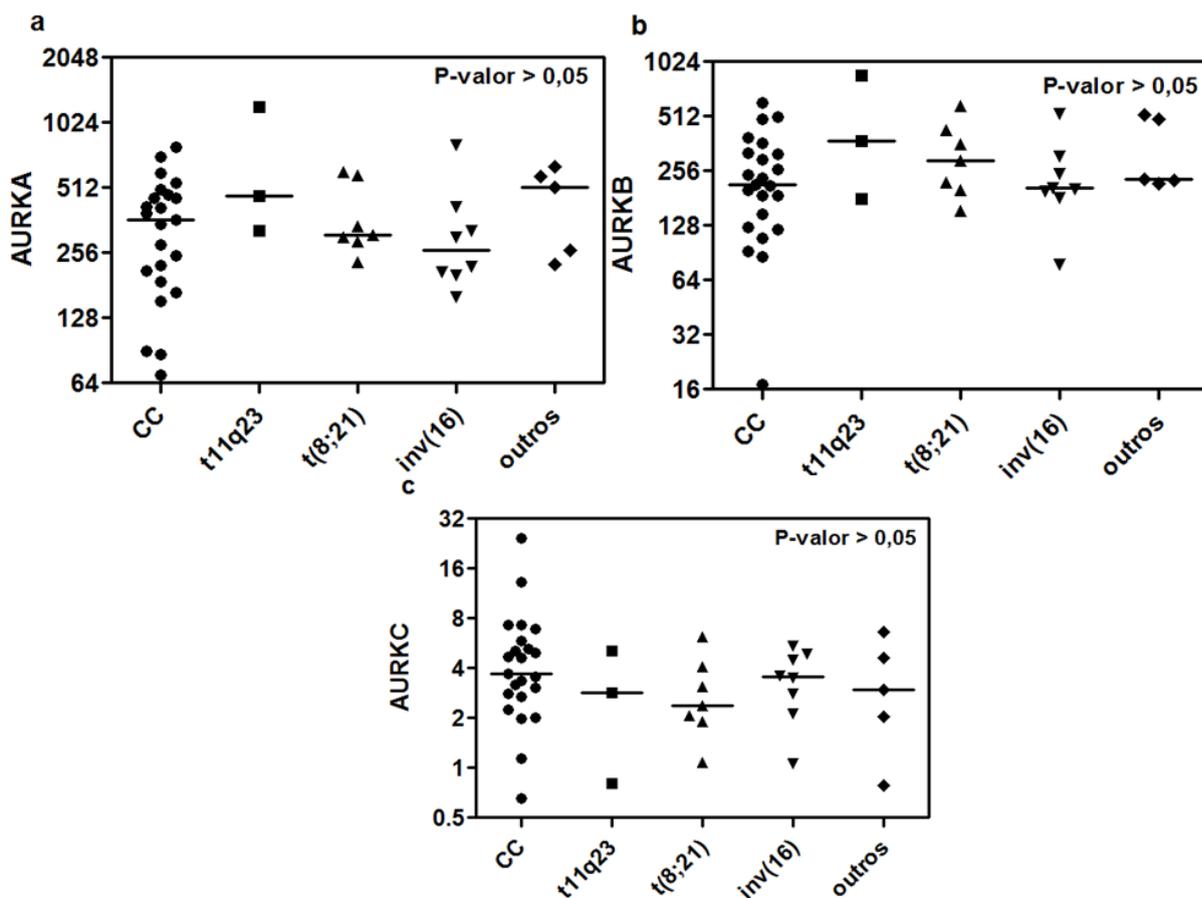


Figura 11. Distribuição dos pacientes nos diferentes tipos de translocações e cariótipo complexo (CC) – coorte TCGA.

Na coorte Beat-AML (Figura 12), a expressão de *AURKA* foi alta na t(11q23). A expressão de *AURKB* e *AURKC* não mostrou diferença estatística, sendo possível observar a similaridade da mediana de *AURKB* entre os grupos escolhidos.

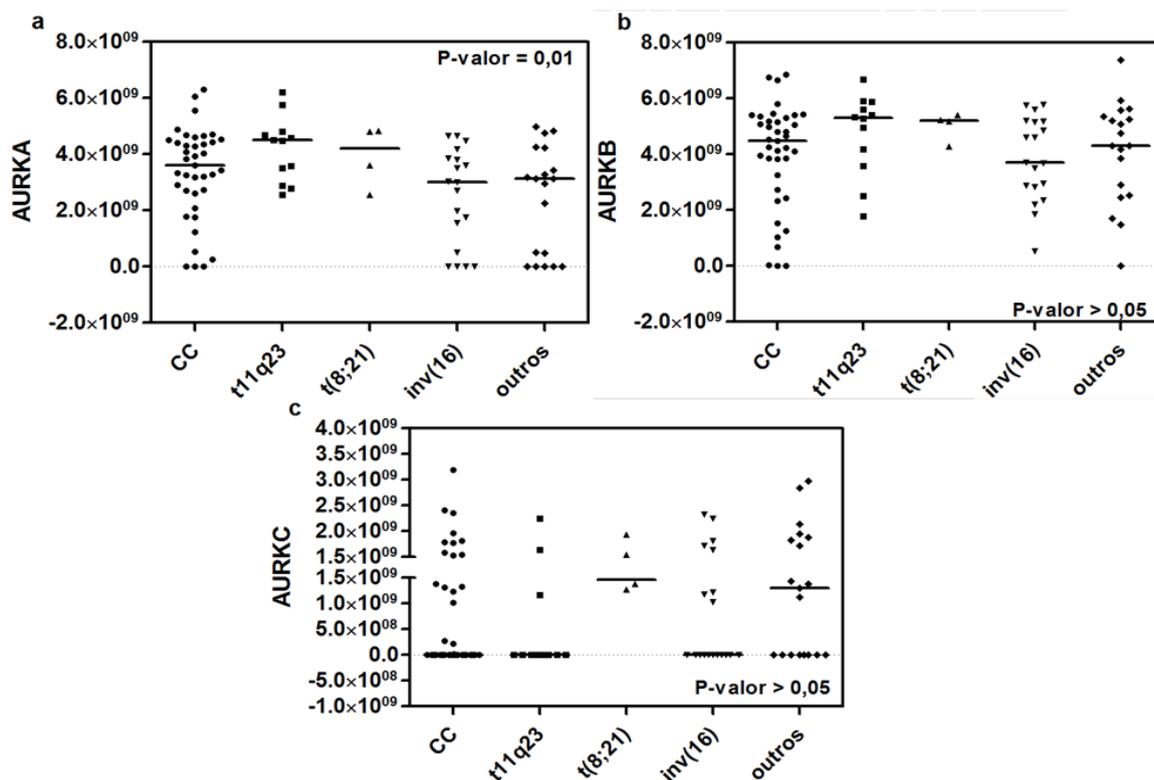


Figura 12. Distribuição dos pacientes nos diferentes tipos de translocações e cariótipo complexo (CC) – coorte Beat-AML.

A expressão de *AURKA* na coorte GSE é maior em pacientes CC (cariótipo complexo) e na t(11q23), entretanto houve uma similaridade na expressão de *AURKA* nos grupos t(8;21) e inv(16). *AURKB* e *AURKC* não mostraram diferença estatística significativa, entretanto foi observado que *AURKC* apresentou expressão similar entre todos os grupos escolhidos.

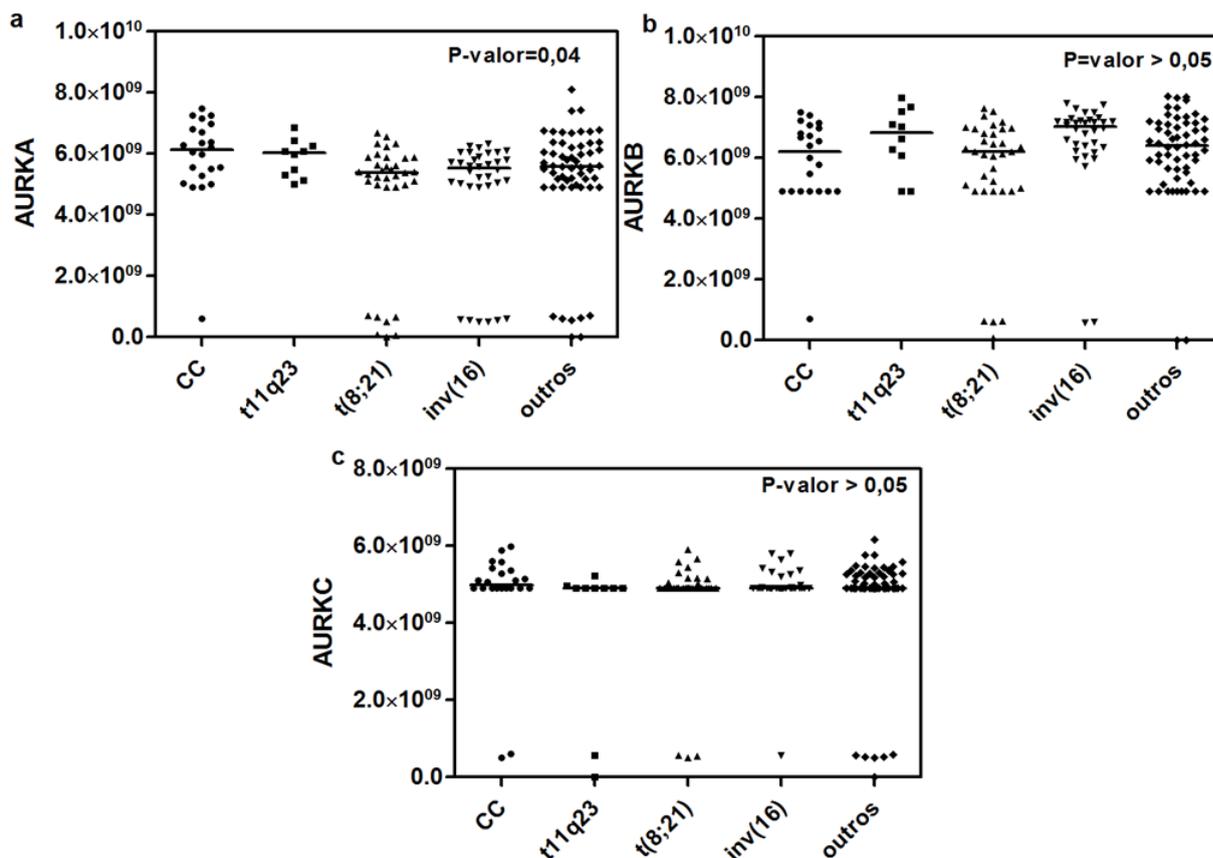


Figura 13. Distribuição dos pacientes nos diferentes tipos de translocações e cariótipo complexo (CC) – coorte GSE.

Na coorte Recife, não foi possível obter o P-valor porque a distribuição entre grupos não atendeu aos critérios para fazer o teste, porém a maior expressão de *AURKA* e *AURKB* foi em cariótipo complexo.

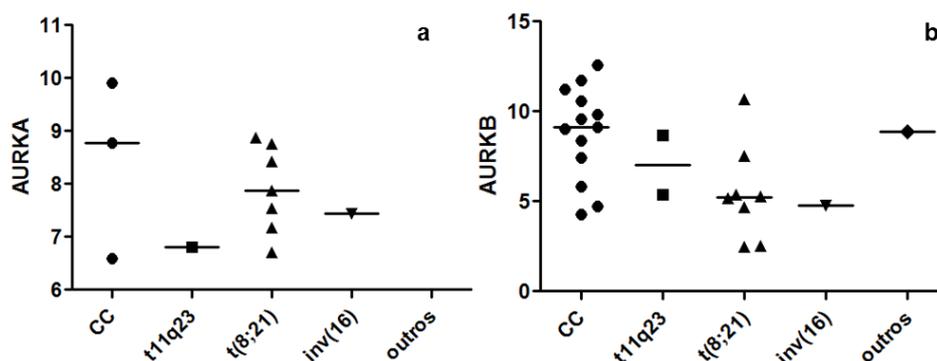


Figura 14. Distribuição dos pacientes nos diferentes tipos de translocações e cariótipo complexo da LAM - coorte Recife.

Na figura 15, podemos observar a expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* nos diferentes tipos de LMA de acordo com a classificação FAB. A expressão de *AURKA* é maior nas LMAs com componentes do que em LMAs mais

indiferenciadas (M0 e M1). O gene *AURKB* tem uma expressão variada entre as LMAs, com a expressão em M6 maior do que as demais.

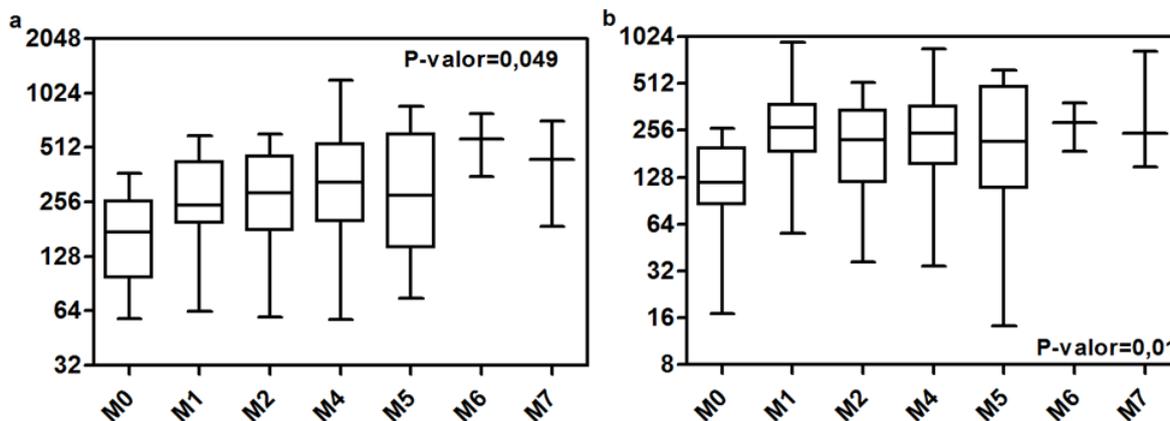


Figura 15. Associação da expressão de (a) *AURKA* e (b) *AURKB* (log2) com a classificação da FAB - coorte TCGA.

4.3 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AURK COM CARIÓTIPO NAS COORTES TCGA, BEAT-AML E GSE

4.3.1 Coorte TCGA

A associação da expressão dos genes *AURKs* na coorte TCGA, composta por 155 pacientes, está discriminada na tabela 2. Os pacientes incluídos neste estudo possuíam informações clínicas (idade e sexo), dados de citogenética (cariótipo normal, cariótipo complexo, t(8;21), etc) e dados de expressão dos três genes alvos deste estudo.

Tabela 2. Comparação entre os genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC*, dividido em Cariótipo normal e Cariótipo alterado, separados pela mediana.

	AURKA		AURKB		AURKC	
	P-valor=0,04*		P-valor =0,57		P-valor=0,37	
	Total: 155		Total: 155		Total: 155	
	N(%)		N(%)		N(%)	
	Mediana		Mediana		Mediana	
	Abaixo	Acima	Abaixo	Acima	Abaixo	Acima
Cariótipo Normal (CN)	30,3	22,7	25,3	27,7	24,5	28,4
Cariótipo Alterado	19,4	27,6	24,5	22,5	25,2	21,9

*Diferença estatisticamente significativa

A análise da expressão gênica com a divisão em dois grupos cariótipos (CN x Alterado) foi feita pela mediana, o que nos permitiu observar que *AURKA*

acima da mediana, teve uma associação com alterações de cariótipo (P-valor = 0,04), porém os demais genes não se comportaram da mesma maneira (P-valor > 0,05). Ao analisar o gráfico (Figura 16), vimos que a distribuição de indivíduos com cariótipo alterado é maior quando *AURKA* em alta expressão.

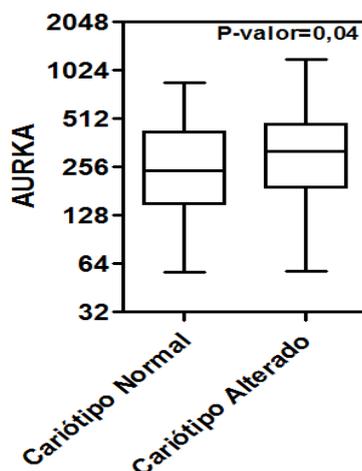


Figura 16. Gráfico demonstrando a associação de *AURKA* com os cariótipos Normal e Alterado.

Para entender aonde as alterações de cariótipo se encaixavam melhor, resolvemos fazer a análise dos indivíduos estratificando mais os grupos (cariótipo normal, cariótipo complexo, translocações/inversões e adições/deleções) e a análise da expressão gênica em quartis. Quando *AURKA* teve baixa expressão (abaixo da mediana), 29,6% pacientes apresentaram cariótipo normal. Porém, quando *AURKA* apresentou expressão aumentada, 9% dos indivíduos tiveram cariótipo complexo, enquanto em 11% houve a ocorrência de translocações/inversões. Quando *AURKB* mostrou expressão aumentada (acima da mediana), 7,1% dos pacientes mostraram cariótipo complexo. Entretanto, quando a expressão de *AURKB* foi baixa, 25,2% apresentaram o cariótipo normal. Contudo, o P-valor dessas expressões foi > 0,05, então não houve diferença estatisticamente significativa. *AURKC* não aparentou ter associação, em alta expressão, com cariótipo complexo.

Tabela 3. Distribuição por quartis da associação dos três genes alvo com os diferentes grupos cariótipos do banco de dados TCGA.

	AURKA				AURKB				AURKC			
	P-valor=0,280				P-valor=0,156				P-valor=0,335			
	Total: 155				Total: 155				Total: 155			
	n(%)				n(%)				n(%)			
	Quartil				Quartil				Quartil			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Cariótipo Complexo (CC)	3,9	4,5	3,2	5,8	3,2	4,5	3,9	3,2	1,3	4,5	5,2	3,9
Cariótipo Normal (CN)	16,1	13,5	11,0	11,0	15,5	9,7	15,5	12,3	13,5	11,0	12,9	15,5
Translocações/Inversões	0,6	3,2	6,5	4,5	0,6	7,1	2,6	4,5	3,2	5,2	4,5	1,9
Adições/Deleções	3,9	3,9	5,2	3,2	0,1	3,9	3,9	4,5	6,5	4,5	2,6	3,9

Os gráficos de dispersão dos genes alvo (Figura 17) na coorte TCGA mostram que translocações/inversões parecem ter algum tipo de associação com *AURKA*, porém não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os dados apresentados.

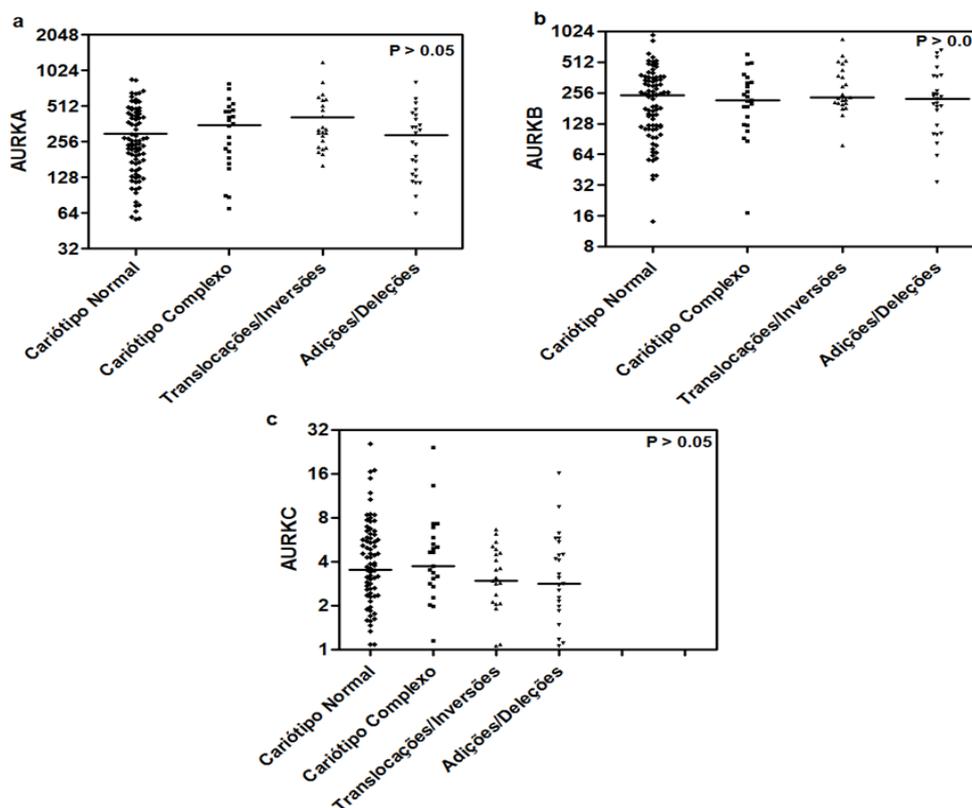


Figura 17. Gráficos de dispersão de (a) *AURKA*, (b) *AURKB* e (c) *AURKC*, com os diferentes grupos cariótipos, da coorte TCGA.

4.3.2 Coorte Beat-AML

A distribuição de pacientes da coorte Beat-AML (326 pacientes) em dois grupos cariótipos apresentou os dados a seguir (Tabela 4). A maior parte dos

pacientes com CN (31,9%) estavam com *AURKB* em baixa expressão (abaixo da mediana). *AURKC* pareceu se comportar de maneira oposta à *AURKA* e *AURKB*, portanto a maior parte dos pacientes com CN (32,8%) apresentou *AURKC* com alta expressão. Entretanto, o P-valor dessa coorte ficou acima de 0,05, portanto não houve diferença estatisticamente significativa, somente uma tendência apresentada por *AURKC* (P-valor=0,07).

Tabela 4. Distribuição de pacientes da coorte Beat-AML divididos pela mediana em dois grupos cariótipos.

	AURKA		AURKB		AURKC	
	P-valor=0,82		P-valor =0,25		P-valor=0,07	
	Total: 326		Total: 326		Total: 326	
	n(%)		n(%)		n(%)	
	Mediana		Mediana		Mediana	
	Abaixo	Acima	Abaixo	Acima	Abaixo	Acima
Cariótipo Normal (CN)	30,6	30,1	31,9	28,9	28	32,8
Cariótipo Alterado	19,4	19,9	18,1	21,1	22	17,2

A tabela 5 mostra a divisão, por quartis, dos três genes alvo deste estudo em comparação com os grupos cariótipos determinados (cariótipo normal, cariótipo complexo, translocações/inversões e adições/deleções). Tanto em *AURKA* (7,1%) como em *AURKB* (6,2%), a porcentagem de pacientes CC diante do total aconteceu quando esses genes estavam acima da mediana. Entretanto, *AURKC* mostra o contrário, com a maior porcentagem de pacientes CC (7,4%) pertencendo aos quartis de baixa expressão desse gene.

O grupo de translocações/inversões apresentou uma similaridade entre os três genes, porém quando *AURKB* estava hiperexpressa, uma porcentagem maior de indivíduos pertencentes a esse grupo (9,5%) fazia parte dos quartis de alta expressão desse gene. No entanto, os valores de P foram maiores que 0,05, fazendo com que esses dados não apresentem uma diferença estatística significativa.

Tabela 5. Distribuição, em quartis, dos pacientes da coorte Beat-AML com quatro grupos cariótipos

	AURKA	AURKB	AURKC
	P-valor= 0,417	P-valor=0,894	P-valor=0,770
	Total: 326	Total: 326	Total: 326
	n(%)	n(%)	n(%)

	Quartil				Quartil				Quartil			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Cariótipo Complexo	2,5	2,5	3,4	3,7	2,8	3,1	3,4	2,8	4,0	3,4	2,5	2,1
Cariótipo Normal	15,3	15,3	17,2	12,9	16,9	15,0	13,8	15,0	13,8	14,1	16,6	16,3
Translocações/Inversões	4,3	4,0	3,7	4,6	3,4	3,7	4,9	4,6	4,6	4,0	3,7	4,3
Adições/Deleções	2,8	3,4	0,9	3,7	1,8	3,4	3,1	2,5	2,5	3,7	2,5	2,1

Os gráficos de dispersão da coorte Beat-AML (Figura 18) demonstram que, a maior parte dos pacientes CN está distribuída abaixo da mediana de *AURKA* e *AURKB*. Entretanto, em *AURKC* essa distribuição está trocada, ou seja, a maior parte dos pacientes CN está acima da mediana do gene. Com $P\text{-valor} > 0,05$, esses dados não possuem diferença estatística significativa.

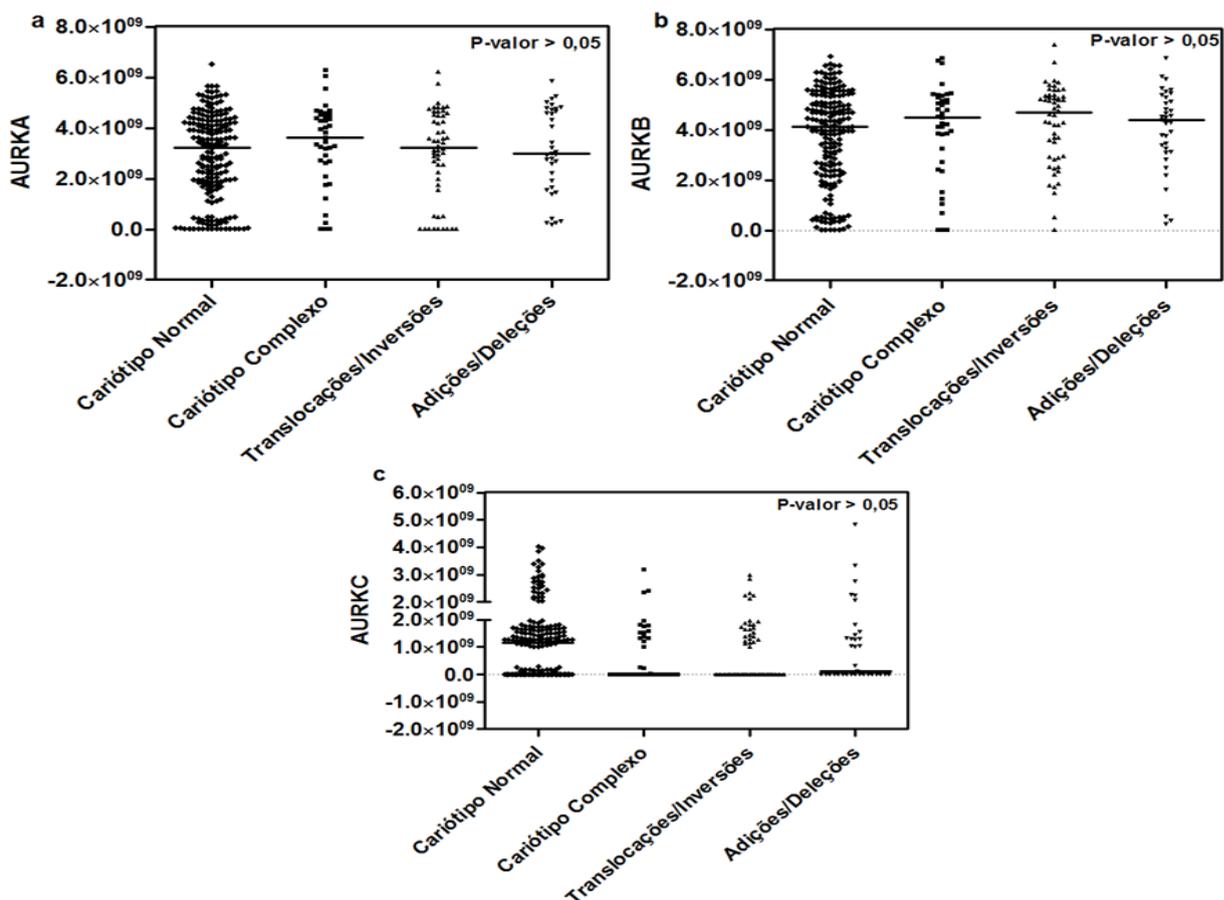


Figura 18. Gráficos de dispersão dos genes (a) *AURKA*, (b) *AURKB* e (c) *AURKC* entre os diferentes grupos cariótipos (cariótipo normal, cariótipo complexo, translocações/inversões e adições/deleções) da coorte Beat-AML.

4.3.3 Coorte GSE

A partir da análise da tabela 6, observamos que *AURKA*, quando em alta expressão, foi associado com alterações de cariótipo (P-valor=0,04), assim como foi demonstrado na coorte TCGA. *AURKB* e *AURKC* parecem ser opostos em sua expressão: enquanto pacientes CN apresentaram uma alta expressão de *AURKB*, com *AURKC*, pacientes CN apresentaram baixa expressão. Entretanto, o P-valor de *AURKB* e *AURKC* foram maiores que 0,05, então não houve diferença estatística significativa.

Tabela 6. Pacientes da coorte GSE divididos em dois grupos cariótipos (CN e Cariótipo Alterado)

	AURKA		AURKB		AURKC	
	P-valor=0,04*		P-valor=0,38		P-valor=0,77	
	Total: 420		Total: 420		Total: 420	
	N(%)		N(%)		N(%)	
	Mediana		Mediana		Mediana	
	Abaixo	Acima	Abaixo	Acima	Abaixo	Acima
Cariótipo Normal (CN)	26,7	21,7	23,1	25,2	27	21
Cariótipo Alterado	23,3	28,3	26,9	24,8	30	22

*Diferença estatisticamente significativa

Quando foi feita a distribuição de pacientes desses dois grupos cariótipos pela mediana (Figura 19), observamos que *AURKB* apresentou um papel de associação com o cariótipo alterado quando em alta expressão (P-valor=0,02).

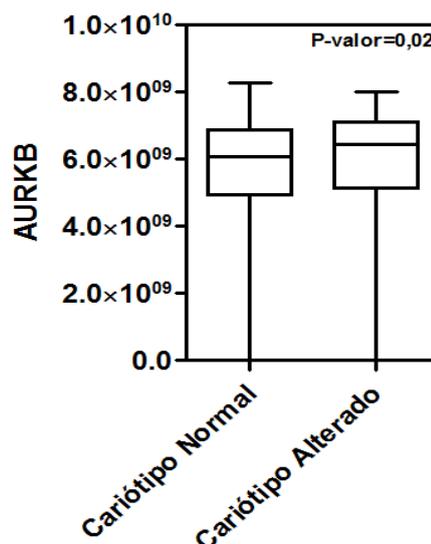


Figura 19. Representação dos grupos cariótipos divididos pela mediana do gene *AURKB*.

Os 420 pacientes que compõem a coorte GSE estão dispostos na tabela 7. Quando *AURKA* estava abaixo da mediana, uma porcentagem maior de pacientes

apresentaram cariótipo complexo, enquanto que quando o gene teve baixa expressão a porcentagem de pacientes com cariótipo normal, translocações/inversões e adições/deleções é maior dentro dessa condição. No que diz respeito a *AURKB*, 24,5% dos pacientes com cariótipo normal que fazem parte da coorte GSE, estão alocados nos quartis de maior expressão de *AURKB*, assim como a maior porcentagem de pacientes que apresentaram translocações/inversões e adições/deleções. O gene *AURKC*, também nessa coorte, aparenta ter uma relação inversa com *AURKB*. No entanto, em todos os três genes o P-valor foi maior que 0,05, então não houve uma diferença estatística relevante.

Tabela 7. Distribuição por quartis da associação dos três genes alvo com os diferentes grupos cariótipos do banco de dados GSE.

	<i>AURKA</i>				<i>AURKB</i>				<i>AURKC</i>			
	P-valor=0,155				P-valor=0,669				P-valor=0,642			
	Total: 420				Total: 420				Total: 420			
	N(%)				N(%)				N(%)			
	Quartil				Quartil				Quartil			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Cariótipo Complexo	1,2	2,1	1,2	0,7	1,2	1,4	1,0	1,7	2,0	1,7	1,2	1,2
Cariótipo Normal	14,8	11,9	11,4	10,2	12,4	10,7	11,1	13,3	13,3	14,0	7,4	13,6
Translocações/Inversões	6,7	7,9	7,9	10,2	8,6	8,3	7,6	8,1	10,0	9,8	6,2	6,7
Adições/Deleções	2,9	2,6	4,3	4,0	4,0	3,3	4,5	1,9	3,6	3,8	3,1	3,3

Nos gráficos de dispersão (Figura 20) a distribuição das amostras, com relação à mediana de *AURKA*, foi homogênea, sem uma clara identificação de qual grupo aparece mais em que tipo de expressão, diferente da distribuição das amostras em relação à *AURKC*, onde a maioria das amostras está acima da mediana do gene. A maioria dos pacientes com cariótipo normal, com cariótipo complexo e do grupo de adições/deleções apareceram abaixo da mediana de *AURKB*, enquanto que no grupo de translocações/inversões, não foi possível observar de maneira exata como a distribuição foi feita. O P-valor dessas distribuições foram maiores que 0,05, porém o P-valor de *AURKB* chegou próximo (P-valor = 0,057).

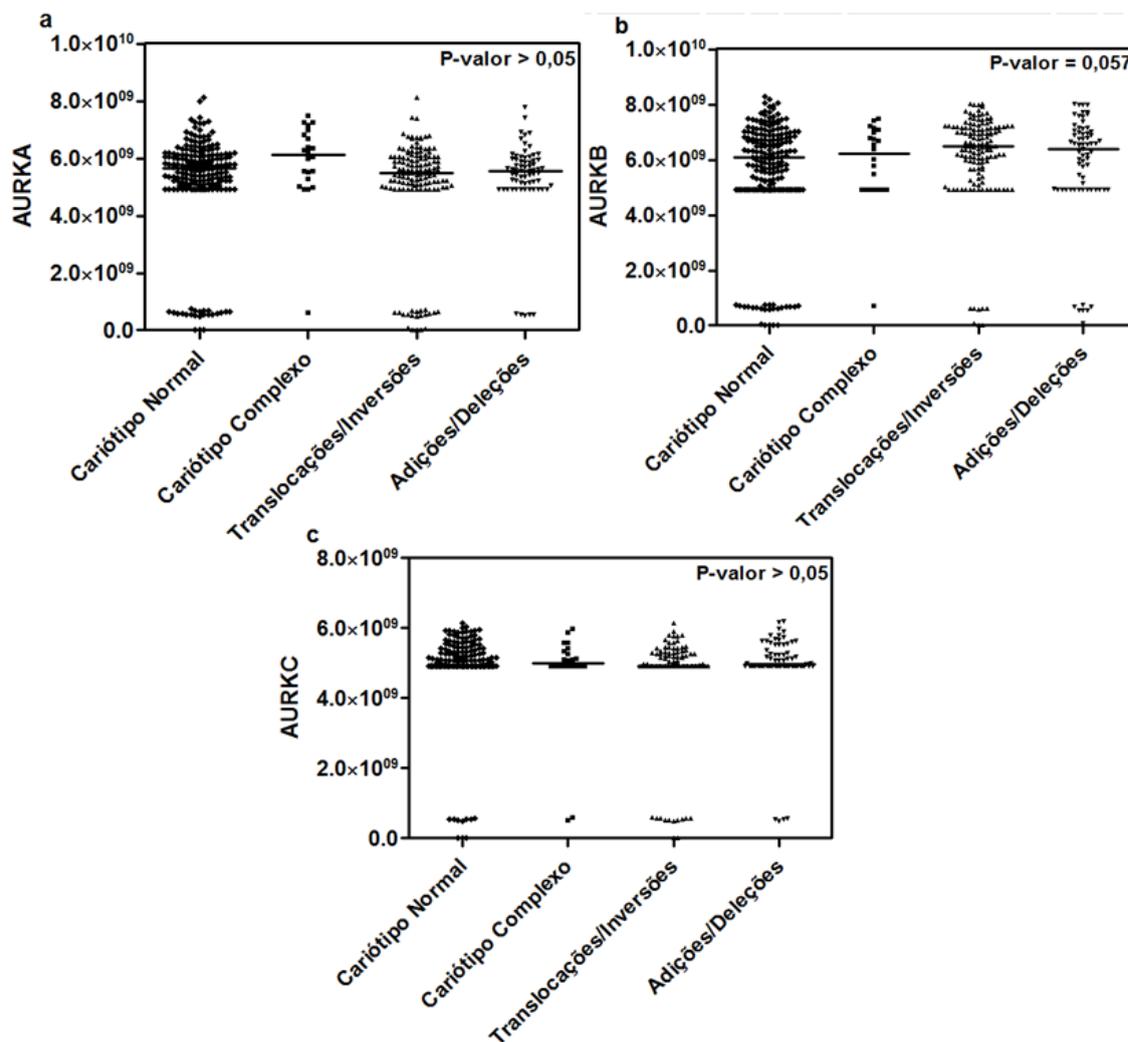


Figura 20. Gráficos de dispersão dos genes (a) AURKA, (b) AURKB e (c) AURKC entre os diferentes grupos cariótipos (cariótipo normal, cariótipo complexo, translocações/inversões e adições/deleções) da coorte GSE.

4.4 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *AURK* COM CARIÓTIPO NA COORTE RECIFE

A coorte Recife possuiu 69 pacientes com expressão de *AURKB* e 30 pacientes com expressão de *AURKA* porque, apesar da sonda ter sido obtida, não houve tempo hábil para realizar o restante das análises.

Ao dividir os pacientes da coorte Recife em dois grupos cariótipos, foi visto que 26,7% dos pacientes CN ficaram abaixo da mediana de *AURKA*, enquanto que a porcentagem de pacientes CN abaixo e acima da mediana de *AURKB* são iguais (24,6%). A maioria dos pacientes com cariótipo alterado, tanto em *AURKA* quanto *AURKB*, se mostraram acima da mediana. Os valores de P foram maiores que 0,05.

Tabela 8. Comparação entre os genes dividido em cariótipo normal e cariótipo alterado, separados pela mediana, pertencentes à coorte Recife.

	AURKA		AURKB	
	P-valor=0,71		P-valor =0,90	
	Total: 30		Total: 69	
	n(%)		n(%)	
	Mediana		Mediana	
	Abaixo	Acima	Abaixo	Acima
Cariótipo Normal (CN)	26,7	23,3	24,6	24,6
Cariótipo Alterado	23,3	26,7	24,6	26,2

Na tabela 9 está representada a coorte Recife totalizando 30 pacientes com expressão do gene *AURKA* e 69 com expressão do gene *AURKB*. Em relação ao cariótipo normal, as maiores porcentagens foram relacionadas a esse grupo, tanto em *AURKA* como em *AURKB*. Apesar de ter um n amostral pequeno, *AURKB* mostrou uma tendência (P-valor=0,07) com relação às translocações, com 13% dos pacientes dentro dos quartis de baixa expressão do gene. *AURKA* não mostrou associação com nenhum dos grupos cariótipos (P-valor>0,05).

Tabela 9. Distribuição, em quartis dos pacientes da coorte Recife com quatro grupos cariótipos

	AURKA				AURKB			
	P-valor=0,11				P-valor=0,07			
	Total: 30				Total: 69			
	n(%)				n(%)			
	Quartil				Quartil			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Cariótipo Complexo	3,3	0,0	3,3	3,3	2,9	2,9	5,8	7,2
Cariótipo Normal	16,7	10,0	3,3	20,0	10,1	14,5	26,7	13,0
Translocações/Inversões	3,3	13,3	13,3	0,0	11,6	1,4	2,9	1,4
Adições/Deleções	0,0	3,3	6,7	0,0	1,4	4,3	5,8	2,9

A figura 21 representa o gráfico com a associação de *AURKB* com os 69 pacientes da coorte Recife (P-valor=0,05), onde o grupo CN ficou distribuído de maneira homogênea ao redor da mediana. No grupo translocações / inversões, a maior parte dos pacientes ficou acima da mediana.

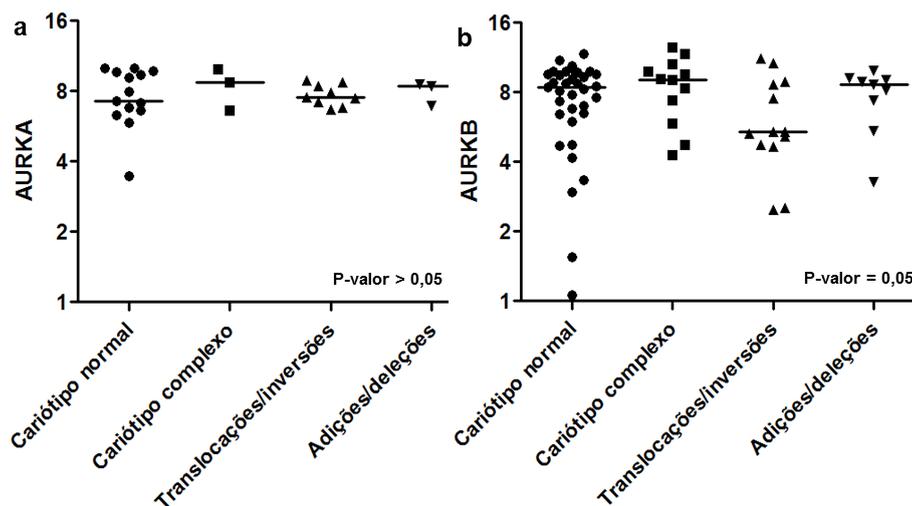


Figura 21. Representação gráfica da associação dos indivíduos dos diferentes grupos cariótipos com os genes (a) *AURKA* e (b) *AURKB*.

4.5 ANÁLISE COMBINADA DAS AURKS NAS COORTES TCGA, GSE E RECIFE

Ao fazer a análise combinada dos genes na coorte TCGA (Tabela 10), foi visto que quando apenas *AURKA* estava acima da mediana, uma porcentagem maior de pacientes apresentou cariótipo complexo, enquanto que quando os três genes estavam abaixo da mediana, mais pacientes apresentaram cariótipo normal.

A prevalência do grupo translocações/inversões também ocorreu quando apenas *AURKA* estava acima da mediana e quando apenas *AURKB* estava abaixo da mediana, o grupo adições/deleções teve sua maior porcentagem mostrada.

Tabela 10. Análise combinada das AURKs na coorte TCGA

	ABC abaixo da Md n(%)	ABC acima da Md n(%)	Apenas A acima da Md n(%)	Apenas B acima da Md n(%)	Apenas C acima da Md n(%)	Apenas A abaixo da Md n(%)	Apenas B abaixo da Md n(%)	Apenas C abaixo da Md n(%)	P-valor
Cariótipo complexo	2,4	2,4	7,1	1,4	1,2	4,8	0,47	0,47	0,047*
Cariótipo normal	8,1	5	5,9	8,1	3,6	6,9	5,5	5,2	
Translocações/inversões	4,5	4,8	6,9	5,5	1,9	2,6	3,5	2,8	
Adições/deleções	2,4	2,14	1,2	1,4	1,2	0,47	2,6	2,4	

*Diferença estatisticamente significativa

A tabela 11 representa os pacientes da coorte GSE e mostra que quando apenas *AURKC* estava acima da mediana, uma porcentagem maior de pacientes apresentou cariótipo normal e a mesma porcentagem de pacientes foi vista quando os três genes se apresentaram acima da mediana ou apenas com *AURKC* abaixo da mediana. Com apenas *AURKC* abaixo da mediana, mais pacientes se apresentaram tanto no grupo translocações/inversões (3,8%) quanto no grupo adições/deleções (4,5%).

Tabela 11. Análise combinada de *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* na coorte GSE.

	ABC abaixo da Md n(%)	ABC acima da Md n(%)	Apenas A acima da Md n(%)	Apenas B acima da Md n(%)	Apenas C acima da Md n(%)	Apenas A abaixo da Md n(%)	Apenas B abaixo da Md n(%)	Apenas C abaixo da Md n(%)	P- valor
Cariótipo complexo	1,29	3,8	1,9	0	3,8	0,6	0,6	2,5	0,049*
Cariótipo normal	10,9	10,3	0,6	1,9	12,9	4,5	0,6	10,9	
Translocações/inversões	1,29	1,9	1,9	1,2	1,9	0	2,5	3,8	
Adições/deleções	3,8	1,9	0,6	1,9	3,2	0	1,29	4,5	

*Diferença estatisticamente significativa

Na análise combinada feita na coorte Recife, 26,7% dos pacientes com cariótipo normal estavam localizados onde *AURKA* e *AURKB* estavam abaixo da mediana e 6,7% dos pacientes com cariótipo complexo estavam no grupo em que apenas *AURKA* estava acima da mediana. Quando *AURKA* e *AURKB* abaixo da mediana, 16,7% dos pacientes com translocações/inversões ficam nesse grupo. A mesma porcentagem de pacientes apareceu nas diferentes combinações de *AURKA* e *AURKB* no grupo de adições/deleções. No entanto, o P-valor foi maior que 0,05, então não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 12. Análise combinada de *AURKA* e *AURKB* na coorte Recife.

	AB abaixo da Md n(%)	AB acima da Md n(%)	Apenas A acima da Md n(%)	P- valor
Cariótipo complexo	3,3	0	6,7	0,55
Cariótipo normal	26,7	3,3	0,2	
Translocações/inversões	16,7	0	13,3	
Adições/deleções	3,3	3,3	3,3	

5 DISCUSSÃO

A caracterização citogenética das leucemias demonstrou ser o fator prognóstico mais importante para resposta e sobrevida, em pacientes jovens e idosos (Blum *et al.*, 2017). Sendo assim, ao invés de dividir os pacientes pelo seu tipo de prognóstico (favorável, intermediário e adverso), optamos por dividir os pacientes entre cariótipos diferentes. A princípio em cariótipo normal (CN) e cariótipo alterado (CA), depois em cariótipo normal, cariótipo complexo (CC), translocações / inversões e adições / deleções para fazer uma associação de maneira mais acurada entre os genes estudados e as alterações cromossômicas vistas nos pacientes.

A frequência de pacientes com LMA que apresentam cariótipo complexo é baixa quando comparada aos pacientes que possuem cariótipo normal (Mrozek, 2008; Dohner *et al.*, 2010; Rollig *et al.*, 2011; Mrozek *et al.*, 2012; Stolzel *et al.*, 2016). O mecanismo por trás do desenvolvimento do CC não é claro, porém dois modelos podem explicar esse mecanismo: evolução clonal (acumulação de alterações cromossômicas independentes em vários ciclos diferentes) e cromotripsis (um único evento catastrófico) (Haferlach *et al.*, 2012; Zemanova *et al.*, 2014). Haferlach *et al.* (2012) demonstraram que cromotripsis e evolução genética sequencial não são mecanismos alternados e sim mecanismos combinados na LMA. Eles observaram que a evolução clonal é mais frequente que a cromotripsis e, portanto pode ser mais importante na patogênese da LMA com CC.

Na tabela 1, o número de pacientes com cariótipo normal (CN) é maioria (Recife = 35/69; TCGA = 82/155; Beat-AML = 198/326; GSE = 203/420). As leucemias de CN, que correspondem a 40-50% dos casos de LMA, apresentam um prognóstico incerto, devido a uma marcante heterogeneidade em relação às alterações moleculares subjacentes e responsividade ao tratamento (Grimwade *et al.*, 2010; Pippa e Odero, 2014).

Neste trabalho foi observada a associação de *AURKB* com cariótipo complexo ($P=0,05$) com a coorte Recife. Esse resultado sustenta a hipótese de que *AURKB* tem um papel na instabilidade cromossômica vista na LMA. Os genes *AURKA* e *AURKB* tem uma alta expressão em diferentes doenças hematológicas, como LMA, LMC e LLA, assim como em diferentes tumores sólidos (Lens *et al.*, 2010; Farag, 2011). A inibição dessas quinases em doenças hematológicas pode

influenciar a divisão celular, parada do ciclo celular e sensibilidade das células à irradiação e melhorar o efeito anti-leucêmico em agentes quimioterápicos (Farang, 2011; Schneider *et al.*, 2012).

Os bancos de dados TCGA (The Cancer Genome Atlas *et al.*, 2013), GSE (Vaarhak *et al.*, 2009) e Beat-AML (Tyner *et al.*, 2018) foram utilizados nessa análise *in silico* pois são ferramentas de uso público, com um número amostral considerável e que têm muitas informações clínicas e de expressão de vários genes utilizados para estudar diversos tipos de cânceres, como a leucemia mielóide aguda.

O banco de células BloodSpot (Bagger *et al.*, 2018) foi utilizado para identificar de que forma os genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* se comportam não só na LMA, mas principalmente em células normais. Neste trabalho, observamos que *AURKB* em células saudáveis tem a maior expressão em mielócitos, e nas células progenitoras hematopoiéticas a expressão é variável, porém também é alta. Nesse trabalho, nós fizemos a análise da expressão de *AURKB* com a classificação FAB da coorte TCGA e confirmamos que *AURKB* está associada tanto com LMAs com componentes maduros, como M4, quanto com LMAs mais indiferenciadas, como M1 ($P=0,01$). Ao analisar *AURKA*, vimos que em células saudáveis, sua maior expressão é em mielócitos, assim como *AURKB*. Ao fazer a análise da expressão com a coorte TCGA, observamos que *AURKA* se associa com LMAs com componentes maduros, como M4 ($P=0,049$). *AURKC*, em células saudáveis da hematopoiese normal, apresenta expressão similar e aparenta ter uma associação com o cariótipo complexo na LMA. Não foi possível fazer essa comparação com as outras coortes porque muitos pacientes não possuíam essa informação. Não há relatos na literatura de associação das AURKs com os diferentes tipos de LMA da classificação FAB.

Oliveira *et al.* (2009) demonstraram alta expressão de *AURKB* em paciente com cariótipo complexo. Depois, Lucena-Araújo *et al.* (2011) demonstraram que *AURKB* estava associado com alterações de cariótipo de prognóstico desfavorável. Nas nossas análises, o gene *AURKB* se mostrou associado com cariótipo alterado na coorte GSE quando em alta expressão ($P=0,02$). Entretanto, não conseguimos observar uma clara associação de *AURKB* com cariótipo complexo.

Em todas as coortes, quando *AURKB* apresenta uma alta expressão, mais

pacientes apresentam translocações/inversões, porém somente na coorte GSE o P-valor se aproximou de 0,05 ($P=0,057$), então não houve diferença estatística significativa, mas uma tendência que se apresentou. Qi *et al.* (2019) publicou um trabalho onde dois inibidores de *AURKA* e *AURKB* (Alisertib e Barasertib) foram testados em duas linhagens celulares (Kasumi-1 e Skno-1) que abrigavam a mutação AML1-ETO da LMA com t(8;21) e viu que esses inibidores regulam a proliferação de LMA com t(8;21) induzindo a acumulação na fase G2/M, particularmente que esse tipo de leucemia é mais sensível à inibição de *AURKB* (Qi *et al.*, 2019).

Nas coortes TCGA e GSE, a alta expressão de *AURKA* está associada com alterações de cariótipo. No artigo publicado por Gritsko em 2003, é dito que a expressão aumentada de *AURKA* é uma característica necessária na tumorigênese, no entanto, a localização celular de *AURKA* também está implicada nessa tumorigênese. Nas células normais, o *AURKA* é expresso principalmente durante a transição de fase G2-M e está localizado nos centrômeros e no fuso mitótico; nas células malignas, o *AURKA* é detectado difusamente por toda a célula (Gritsko *et al.*, 2003). Nas células com alta expressão de *AURKA*, a mitose é caracterizada pela presença de múltiplos centrômeros e fusos multipolares (Bischoff *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Meraldi *et al.*, 2002). Apesar do microtúbulo-cinetócoro aberrante acessório resultante, as células anulam o ponto de verificação mitótico e progridem da metáfase para a anáfase, resultando em vários defeitos de separação cromossômica. Essas células não sofrem citocinesia e, com ciclos celulares adicionais, se desenvolve poliploidia e instabilidade cromossômica progressiva (Meraldi *et al.*, 2002; Anand *et al.*, 2003).

O gene *AURKC* não teve associação com nenhum dos grupos cariótipos em nenhuma das coortes estudadas. Pouco se sabe sobre o papel de *AURKC* na transformação para malignidade, assim como seu papel no desenvolvimento de cânceres (Carvajal *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2006; Pollard e Mortimore, 2009; Dar *et al.*, 2010; Pitts *et al.*, 2014). *AURKC* é aberrantemente expressa em linhagens celulares de cânceres invasivos de mama e próstata (Zekri *et al.*, 2012). Um estudo mostrou que essa alta expressão induziu uma divisão celular anormal resultando na amplificação do centrômero, multinucleação e aumento da proliferação (Tsou *et al.*, 2011). Ulisse *et al.* (2006) mostrou que a expressão de *AURKA* e *AURKB* foram reguladas no nível transcricional, enquanto *AURKC* foi

modulada no nível pós-transcricional (Ulisse *et al.*, 2006). Yazarloo *et al.* (2013) não viu associação de *AURKC* com LMA. Portanto quando foi feita a coorte Recife, foi decidido que não valia a pena incluir o gene *AURKC* nas análises.

Na análise combinada das *AURKs*, observamos que, na coorte TCGA ($P=0,047$), quando apenas *AURKA* estava acima da mediana, mais pacientes apresentavam cariótipo complexo e translocações/inversões. Na coorte GSE ($P=0,049$), quando apenas *AURKC* estava abaixo da mediana, mais pacientes apresentaram translocações/inversões e adições/deleções. Nguyen *et al.* (2018) mostrou que *AURKB* regula negativamente *AURKC* na meiose e Tsou *et al.* (2011) demonstrou que a hiperexpressão de *AURKC* diminui a expressão de *AURKB* em células cancerígenas (Tsou *et al.*, 2011, Nguyen *et al.*, 2018). A relação de *AURKA* com *AURKC* não é bem estabelecida, porém Mesic *et al.* (2016) demonstrou uma associação entre *AURKA* e *AURKC* em células de câncer gástrico. Portanto, mais estudos são necessários para entender como esses dois genes se relacionam. Na relação de *AURKA* e *AURKB* na literatura (Lucena-Araújo *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014), a hiperexpressão desses genes, de maneira independente, está associada com a LMA. Entretanto, um estudo de dos Santos *et al.* (2016) diz que a oncogênese é induzida por *AURKA* e / ou *AURKB* e que a inibição de *AURKA* e / ou *AURKB* pode ser alvo terapêutico para o câncer de pulmão (dos Santos *et al.*, 2016).

6 CONCLUSÕES

Diantes dos resultados apresentados é possível concluir que:

1. Pacientes com cariótipo normal representam cerca de 50% dos casos de LMA abordados neste estudo;
2. A alta expressão de *AURKA* está associada com cariótipo alterado na LMA;
3. A alta expressão de *AURKB* está associada com cariótipo complexo na LMA, porém mais estudos precisam ser feitos para confirmar a associação desse gene com translocações/inversões;
4. *AURKC* não aparenta ter associação com a LMA de maneira independente, porém parece regular negativamente a expressão de *AURKB*. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa informação.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C et al. **“Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies”** *Blood*, vol. 114, no. 1, pp. 144–147, 2009.
- Adams RR, Wheatley SP, Gouldsworthy AM, Kandels-Lewis SE, Carmena M, Smythe C, Gerloff DL e Earnshaw WC. **INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow.** *Curr Biol* 10: 1075–1078. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00673-4, 2000.
- Alcalay M, Orleth A, Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, Scirpi MT, Gelmetti V, Riganelli D, Menucci S. **Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia.** *Oncogene* 20:5680-5694, 2001. doi: 10.1038/sj.onc.1204642
- Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. **AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol.** *Cancer Cell* 3:51–62, 2003 doi: 10.1016/s1535-6108(02)00235-0
- Appelbaum F, Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, et al. **Acute leukemia in adults.** *Abeloff’s Clinical Oncology*. 5th edition. Philadelphia: Elsevier. 1890–906, 2014
- Arber DA, Carter NH, Ikle D, Slovak ML. **Value of combined morphologic, cytochemical, and immunophenotypic features in predicting recurrent cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia.** *Human Pathology* 34(5): 479–483, 2003 doi:10.1016/s0046-8177(03)00085-6
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz, MJ, Le Beau, MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** *Blood*, 127(20), 2391–2405, 2016 doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
- Bagger FO, Kinalis S, Rapin N. **BloodSpot: a database of healthy and malignant haematopoiesis updated with purified and single cell mRNA sequencing profiles** *Nucl. Acids Res.* 47: D881–D885, 2018. doi: 10.1093/nar/gky1076
- Bayliss R, Sardon T, Vernos I, Conti E. **Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle.** *Mol Cell* ,12: 851–862, 2003
- Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR e Sultan C. **Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.** *Br J Haematol* 33:451-458, 1976 doi: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick Hr e Sultan C. **Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7): A Report of the French-American-British Cooperative Group.** *Ann Intern Med* 103: 460-462, 1985 doi: 10.7326/0003-4819-103-3-460
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR e Sultan C. **Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO).** *Br J Haematol* 78:325-329, 1991 doi: 10.1111/j.1365-2141.1991.tb04444.x
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ e Plowman GD. **A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and**

- amplified in human colorectal cancers.** EMBO J 17: 3052–3065, 1998 doi: 10.1093/emboj/17.11.3052
- Bloomfield CD, Goldman A, Hassfeld D e de la Chapelle A. **Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia.** Cancer Genet Cytogenet 11(3):332-50, 1984 doi: 10.1016/s0165-4608(84)80022-9
- Blum S, Greve G, Lubbert M **Innovative strategies for adverse karyotype acute myeloid leukemia (Review).** Curr Opin Hematol 24: 89-98, 2017 doi: 10.1097/MOH.0000000000000318.
- Boss DS, Witteveen PO, van der Sar J, Lolkema MP, Voest EE, Stockman PK, Ataman O, Wilson D, Das S, Schellens JH. **Clinical evaluation of AZD1152, an i.v. inhibitor of Aurora B kinase, in patients with solid malignant tumors.** Ann Oncol 22:431–7, 2011
- Brittle AL, Nanba Y, Ito T, Ohkura H. **Concerted action of Aurora B, Polo and NHK-1 kinases in centromerespecific histone 2A phosphorylation.** Exp Cell Res. 313:2780–85, 2007. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.04.038
- Buchner T, Berdel WE, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T, Serve H, Muller-Tidow C, Braess J, Spiekermann K, Kienast J, et al. **Long-term results in patients with acute myeloid leukemia (AML): the influence of high-dose AraC, G-CSF priming, autologous transplantation, prolonged maintenance, age, history, cytogenetics, and mutation status.** Data of the AMLCG 1999 Trial. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 114, 485, 2009
- Bullinger L e Armstrong SA. **HELP for AML: Methylation Profiling Opens New Avenues.** Cancer Cell 17(1):1–3, 2010 doi:10.1016/j.ccr.2009.12.033
- Cabral BF. **Escalas de performance. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.** 2011
- Cammareri P, Scopelliti A, Todaro M, Eterno V, Francescangeli F, Moyer MP, Agrusa A, Dieli F, Zeuner A, Stassi G. **Aurora-a is essential for the tumorigenic capacity and chemoresistance of colorectal cancer stem cells.** Cancer Res. 70(11):4655-65, 2010
- CANADIAN CANCER STATISTICS. **Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada. Government of Canada,** 39, 8/9, 2019. doi: <https://doi.org/10.24095/hpcdp.39.8/9.04>
- Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, et al. **Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.** N Engl J Med. 368(22), 2059–2074, 2013 doi:10.1056/NEJMoa1301689
- Carmena M e Earnshaw WC. **The cellular geography of aurora kinases.** Nat Rev Mol Cell Biol 4:442–54, 2003
- Casorzo L, Dell'Aglio C, Sarotto e Risio M. **Aurora kinase A gene copy number is associated with the malignant transformation of colorectal adenomas but not with the serrated neoplasia progression.** Hum Pathol. 46(3):411-418, 2015
- Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK. **Aurora kinases: new targets for cancer therapy.** Clin Cancer Res 12(23):6869-75, 2006
- Carvalho QGS, Pedrosa WA e Sebastião QP. **Leucemia mieloide aguda versus ocupação profissional: perfil dos trabalhadores atendidos no Hospital**

- de Hematologia de Recife.** Rev Esc Enferm USP, 45(6):1446-51, 2011
- Castro-Gamero AM, Pezuk JA, Brassesco MS, Tone LG (2018) **G2/M inhibitors as pharmacotherapeutic opportunities for glioblastoma: the old, the new, and the future.** Cancer Biol Med 15(4):354-374. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0030
- Choudary I, Barr PM e Friedberg J. **Recent advances in the development of Aurora kinases inhibitors in hematological malignancies.** Ther Adv Hematol 6(6): 282–294, 2015
- Cirak Y, Furuncuoglu Y, Yapicier O, Aksu A e Cubukcu E. **Aurora A overexpression in breast cancer patients induces taxane resistance and results in worse prognosis.** J BUON. 20(6):1414-1419, 2015
- Conway O'brien E, Prideaux S, Chevassut T. **The Epigenetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia.** Adv Hematol 2014:103175, 2014 doi: 10.1155/2014/103175
- Cowley DO, Rivera-Pérez JA, Schliekelman M, He YJ, Oliver TG, Lu L, O'Quinn R, Salmon ED, Magnuson T, Van Dyke T. **Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development.** Mol Cell Biol 29:1059–71, 2009 doi: 10.1128/MCB.01062-08.
- Dar AA, Goff LW, Majid S, Berlin J, El-Rifai W. **Aurora kinase inhibitors – rising stars in cancer therapeutics?** Mol Cancer Ther 9(2):268-78, 2010 doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0765
- De Kouchkovsky I e Abdul-Hay M. **Acute myeloid leucemia: a comprehensive review and 2016 update.** Blood Cancer J 6(7):e441, 2016. doi: 10.1038/bcj.2016.50.
- De Oliveira FM, Lucena-Araújo AR, Leite-Cueva SD, Santos GAS, Rego EM & Falcão RP. **Segmental amplification of MLL gene associated with high expression of AURKA and AURKB genes in a case of acute monoblastic leukemia with complex karyotype.** Cancer Genetics and Cytogenetics, 198(1), 62–65, 2010 doi:10.1016/j.cancergencyto.2009.12.005
- Dexter TM E Testa NG. **Chapter 34 Differentiation and Proliferation of Hemopoietic Cells in Culture. Methods in Cell Biology,** 387–405, 1976 doi:10.1016/s0091-679x(08)60498-7.
- Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, Perrin J, Martinez D, Sèle B, Jouk PS, Ohlmann T, Rousseaux S, Lunardi J, Ray PF **Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility.** Nat Genet 39: 661–665, 2007. doi: 10.1038/ng2027
- Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H. **Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations.** Blood 106:3740-3746, 2005.
- Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, et al. **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.** Blood 115:453-474, 2010. doi: 10.1182/blood-2009-07-235358.
- Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, et al. **Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert**

- panel.** Blood 129(4):424–447, 2017 doi:10.1182/blood-2016-08-733196
- Dos Santos EO, Carneiro-Lobo TC, Aoki MN, Levantini E, Basseres DS. **Aurora kinase targeting in lung cancer reduces KRAS-induced transformation.** Mol Cancer.15:12, 2016
- Earnshaw WC e Bernat RL. **Chromosomal passengers: towards an integrated view of mitosis.** Chromosoma 100(3):139–146, 1990 doi: 10.1007/bf00337241
- Estey EH. **Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management.** Am J Hematol 87:89-99, 2012
- Estey EH. **Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management.** Am J Hematol 88:318-327, 2013
- Estey EH. **Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management.** Am J Hematol 89(11):1063-81, 2014. doi: 10.1002/ajh.23834
- Farag SS. **The potential role of Aurora kinase inhibitors in haematological malignancies.** Br J Haematol 155:561–579, 2011. doi: 10.1038/s41375-019-0390-3.
- Ferrara F, Mirto S. **Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly.** Br J Haematol 92(3):627–631, 1996. doi:10.1046/j.1365-2141.1996.00398.x
- Fu J, Bian M, Liu J, Jiang Q, Zhang C. **A single amino acid change converts Aurora-A into Aurora-B-like kinase in terms of partner specificity and cellular function.** Proc Natl Acad Sci USA 106(17): 6939–6944, 2009. doi:10.1073/pnas.0900833106
- Gaidzik V e Dohner K. **Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics.** Semin Oncol 35(4): 346–355, 2008.
- Gilliland DG. **Hematologic malignancies.** Current Opinions in Haematology, 8:189–191, 2001
- Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN, Gandara, DR. **Aurora Kinases as Anticancer Drug Targets.** Clinical Cancer Research, 14(6), 1639–1648, 2008. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-2179
- Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. **Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles.** Cell 81(1):95–105, 1995. doi: 10.1016/0092-8674(95)90374-7
- Goldenson B e Crispino JD. **The aurora kinases in cell cycle and leukemia.** Oncogene, 34(5), 537–545, 2015. doi:10.1038/onc.2014.14
- González-Loyola A, Fernández-Miranda G, Trakala M, Partida D, Samejima K, Ogawa H, Cañamero M, de Martino A, Martínez-Ramírez Á, de Cárcer G, et al. **Aurora B overexpression causes aneuploidy and p21Cip1 repression during tumor development.** Mol Cell Biol. 35(20):3566–78, 2015. doi: 10.1128/MCB.01286-14
- Goos JA, Coupe VM, Diosdado B, Delis-Van Diemen PM, Karga C, Belien JA, Carvalho B, van den Tol MP, Verheul HM, Geldof AA, et al. **Aurora kinase A (AURKA) expression in colorectal cancer liver metastasis is associated with poor prognosis.** Br J Cancer. 109(9):2445-2452, 2013
- Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. **Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation.** Genes Cells 7(1):11–17, 2002 doi: 10.1046/j.1356-9597.2001.00498.x
- Graux C, Sonet A, Maertens J, Duyster J, Greiner J, Chalandon Y, Martinelli G, Hess D, Heim D, Giles FJ, et al. **A phase I dose-escalation study of**

- MSC1992371A, an oral inhibitor of aurora and other kinases, in advanced hematologic malignancies**, *Leuk. Res.* 37(9): 1100–1106, 2013. doi: 10.1016/j.leukres.2013.04.025.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK. **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, 2010. doi: 10.1182/blood-2009-11-254441
- Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, Fiorica JV, Nicosia SV, Cheng JQ. **Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer**. *Clin Cancer Res.* 9(4):1420-1426, 2003.
- Gurden MD, Anderhub SJ, Faisal A, Linardopoulos S. **Aurora B prevents premature removal of spindle assembly checkpoint proteins from the kinetochore: A key role for Aurora B in mitosis**. *Oncotarget* 9(28):19525-19542, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.10657.
- Haferlach C, Zenger M, Staller M, Grossmann V, Kohlmann A, Kern W, Schnittger S, Haferlach T. **Sequential evolution versus a single catastrophic event (chromothripsis) in the pathogenesis of AML with complex aberrant karyotype**. *Blood* 120: 517, 2012
- Hans F, Skoufias DA, Dimitrov S, Margolis RL (2009) **Molecular distinctions between Aurora A and B: a single residue change transforms Aurora A into correctly localized and functional Aurora B**. *Mol Biol Cell* 20(15): 3491–3502. doi: 10.1091/mbc.E09-05-0370.
- Harrington EA , Bebbington D , Moore J , Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec JM, Miller KM. **VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo**. *Nat Med* 10(3): 262 – 267, 2004. doi: 10.1038/nm1003
- Hasserjian RP. **Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification**. *Int J Lab Hematol* 35(3): 358-366, 2013. doi: 10.1111/ijlh.12081
- He L-Z, Merghoub T, Pandolfi PP. **In vivo analysis of the molecular pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia in the mouse and its therapeutic implications**. *Oncogene*, 1999 18:5278, 1999.
- Heerema-McKenney A e Arber DA. **Acute myeloid leukemia**. *Hematol Oncol Clin North Am* 23(4): 633-654, 2009. doi: 10.1016/j.hoc.2009.04.003.
- Heo SK, Noh EK, Jeong YK, Ju LJ, Sung JY, Yu HM, Cheon JY, Koh SJ2, Min YJ, Choi YS, Jo JC. **Radotinib inhibits mitosis entry in acute myeloid leukemia cells via suppression of Aurora kinase A expression**. *Tumor Biology*, 41(5), 2019.
- Honda R, Korner R, Nigg EA. **Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis**. *Mol Biol Cell* 14(8): 3325–3341, 2003. doi: 10.1091/mbc.e02-11-0769
- Hou HA, Lin CC, Chou WC, Liu CY, Chen CY, Tang JL, Lai YJ, Tseng MH, Huang CF, Chiang YC, et al. **Integration of cytogenetic and molecular alterations in risk stratification of 318 patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia**. *Leukemia* 28(1): 50-58, 2014. doi:

- 10.1038/leu.2013.236
- Hu HM, Chuang CK, Lee MJ, Tseng TC, Tang TK. **Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1.** DNA Cell Biol. 19(11), 679–688, 2000. doi: 10.1089/10445490050199063
- Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kumayama Y, Komatsu N, Bandobashi K, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H. **A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia.** Mol Cancer Ther 6(6): 1851-1857, 2007.. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0067
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) **Diretrizes para vigilância do câncer relacionado ao trabalho**, 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 130p, 2019
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds). **World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues.** IARC Press Lyon, 2001
- Juliusson G. **Older patients with acute myeloid leukemia benefit from intensive chemotherapy: an update from the Swedish Acute Leukemia Registry.** Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2011;11(Suppl 1):S54–S59, 2011
- Kaestner P, Stolz A, Bastians H. **Determinants for the efficiency of anticancer drugs targeting either Aurora-A or Aurora-B kinases in human colon carcinoma cells.** Mol Cancer Ther 8(7): 2046–2056, 2009. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0323
- Kansal R. **Acute myeloid leukemia in the era of precision medicine: recent advances in diagnostic classification and risk stratification.** Cancer Biol Med 13(1): 41-54, 2016 doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0001.
- Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S. **Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2- mediated destabilization and inhibition of p53.** Nat Genet. 36:55–62, 2004.
- Keen N e Taylor S **Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents.** Nat Rev Cancer 4:927–36, 2004
- Kimmins S, Crosio C, Kotaja N, Hirayama J, Monaco L, Hoog C, van Duin M, Gossen JA, Sassone-Corsi P. **Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis.** Mol Endocrinol 21(3): 726–739, 2007. doi: 10.1210/me.2006-0332
- Kimura M, Kotani S, Hattori T, Sumi N, Yoshioka T, Todokoro K, Okano Y. **Cell cycledependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1.** J Biol Chem 1997; 272(21): 13766–13771, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.21.13766
- Knowlton AL, Lan W, Stukenberg PT. **Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK.** Curr Biol. 16:1705–10, 2006 doi: 10.1016/j.cub.2006.07.057
- Kollareddy M, Zheleva D, Dzubak P, Brahmkshatriya PS, Lepsik M, Hajduch M. **Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic.** Invest New Drugs 30(6): 2411-2432, 2012 doi: 10.1007/s10637-012-9798-6
- Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, Wadleigh M,

- DeAngelo DJ, Stone RM, Sakamaki H, et al. **Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials.** JAMA. 301(22): 2349-2361, 2009. doi: 10.1001/jama.2009.813.
- Kovarikova V, Burkus J, Rehak P, Brzakova A, Solc P, Baran V. **Aurora kinase A is essential for correct chromosome segregation in mouse zygote.** Zygote 24(3):326-337, 2016. doi: 10.1017/S0967199415000222
- Krug UO, Berdel W, Amler S, Sauerland MC, Wormann B, Hiddemann W, Buchner T. **Continuous decrease of overall survival in patients > 30 years of age with acute myelogenous leukemia.** Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 114, Abstract 998, 2009.
- Krystyniak A, Garcia-Echeverria C, Prigent C, Ferrari S. **Inhibition of Aurora A in response to DNA damage.** Oncogene 25(3): 338–348, 2006. doi: 10.1038/sj.onc.1209056
- Kulsoom B, Shamsi TS, Ahmed N, Hasnain SN. **Recent advances in diagnostic and prognostic aspects of acute myeloid leukaemia.** J Pak Med Assoc 67(10): 1580-1587, 2017
- Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V, Gómez-Guijosa MÁ, Cortes-Penagos C **Acute myeloid leucemia-Genetic alterations and their clinical prognosis.** Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 11(4): 328-339, 2017
- Lazarus HM, Litzow MR. **AML cytogenetics: the complex just got simpler.** Blood 120(12): 2357-2358, 2012. doi: 10.1182/blood-2012-08-448555
- Lens SM, Voest EE, Medema RH. **Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer.** Nat Rev Cancer 10(12): 825-841, 2010. doi: 10.1038/nrc2964.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ et al., **DNMT3A mutations in acute myeloid Leukemia** The New England Journal of Medicine, vol. 363, no. 25, pp. 2424–2433, 2010.
- Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, et al. **Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.** N Engl J Med 368(22):2059–2074, 2013. doi: 10.1056/NEJMoa1301689
- Liersch R, Muller-Tidow C, Berdel WE, Krug U. **Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults – biological significance and clinical use.** Br J Haematol 165(1): 17-38, 2014 doi: 10.1111/bjh.12750
- Liesveld J. **Management of AML: who do we really cure?** Leuk Res 36(12): 1475-1480, 2012 doi: 10.1016/j.leukres.2012.08.006.
- Lima AS, de Mello MR, Fernandes E, Bezerra MF, Oliveira MM, Duarte BK, de Assis RA, Souto FR, Ramos CF, Machado CG, Pagnano K, Lucena-Araujo AR, Lorand-Metze I, Bezerra MA. **Clinical outcomes of patients with acute myeloid leukemia: evaluation of genetic and molecular findings in a real-life setting.** Blood 126(15): 1863-1865, 2015 doi: 10.1182/blood-2015-07-657551
- Look AT . **Oncogenic transcription factors in the human acute leucemias.** Science 278(5340): 1059-1064, 1997. doi: 10.1126/science.278.5340.1059
- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. **Acute myeloid leukemia.** N Engl J Med 341(14): 1051-1062, 1999. doi: 10.1056/NEJM199909303411407
- Lu LY, Wood JL, Ye L, Minter-Dykhouse K, Saunders TL, Yu X, Chen J. **Aurora A is essential for early embryonic development and tumor suppression.** J Biol Chem 283:31785–31790, 2008.

- Lucena-Araujo AR, de Oliveira FM, Leite-Cueva SD, dos Santos GA, Falcao RP, Rego EM. **High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia.** *Leuk Res* 35(2): 260-264, 2011. doi: 10.1016/j.leukres.2010.07.034
- Marcucci G, Haferlach T e Dohner H. **Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications.** *J Clin Oncol* 29(5): 475–486, 2011.
- Marumoto T, Honda S, Hara T, Nitta M, Hirota T, Kohmura E et al. (2003) **Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells.** *J Biol Chem*, 278: 51786–51795.
- Mesic A, Rogar M, Hudler P, Juvan R, Komel R. **Association of the AURKA and AURKC gene polymorphisms with an increased risk of gastric cancer.** *IUBMB Life*, 68(8), 634–644, 2016. doi:10.1002/iub.1521
- Meyer SC, Levine RL **Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia.** *Lancet Oncol* 15(9): e382-394, 2014. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70008-7.
- Mignogna C, Staropoli N, Botta C, De Marco C, Rizzuto A, Morelli M, Di Cello A, Franco R, Camastra C, Presta I, et al. **Aurora Kinase A expression predicts platinum-resistance and adverse outcome in high-grade serous ovarian carcinoma patients.** *J Ovarian Res.* 9:31, 2016.
- Moore AS, Blagg J, Linardopoulos S, e Pearson, ADJ. **Aurora kinase inhibitors: novel small molecules with promising activity in acute myeloid and Philadelphia-positive leukemias.** *Leukemia* 24(4): 671–678, 2010.
- Mori D, Yano Y, Toyo-oka K, Yoshida N, Yamada M, Muramatsu M et al. **NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment.** *Mol Cell Biol*; 27: 352–367, 2007.
- Mountzios G, Terpos E, Dimopoulos MA. **Aurora kinases as targets for cancer therapy.** *Cancer Treat Rev.* 34:175–82, 2008.
- Mrozek K, Heinonen K, Bloomfield CD. **Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia.** *Best Pract Res Clin Haematol* 14(1):19-47, 2001. doi: 10.1053/beh.2000.0114
- Mrozek K. **Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype.** *Semin Oncol* 35:365–377, 2008.
- Mrozek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeker KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J, Pattenati MJ, Heerema NA, Block AW, Patil SR, Baer MR, Kolitz JE, Moore JO, Carroll AJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. **Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia.** *J Clin Oncol* 30: 4515–4523, 2012
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER cancer statistics review, 1975-2015: overview, median age at diagnosis. 2018. Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/. Acessado em 23 de junho, 2019.
- Nguyen AL, Drutovic D, Vazquez BN, Yakoubi WE, Gentilello AS, Malumbres M, Solc P, Schindler K. **Genetic interactions between the Aurora kinases reveal new requirements for AURKB and AURKC during oocyte meiosis.** *Curr Biol.* 28(21): 3458–3468.e5, 2018.

doi:10.1016/j.cub.2018.08.052.

- Nigg EA. **Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2(1):21-32, 2001. doi:10.1038/35048096
- Ogawa S, Mitani K, Sato Y, Sugimoto K, Toyoshima H, Mano H, Takaku F, Yazaki Y, Hirai H. **Detection of the PML/RAR alpha fusion gene in acute promyelocytic leukemia with a complex translocation involving chromosomes 15, 17, and 18.** Cancer Genet Cytogenet 69(2): 113-117, 1993. doi: 10.1016/0165-4608(93)90084-y
- Ouchi M, Fujiuchi N, Sasai K, Katayama H, Minamishima YA, Ongusaha PP, Deng C, Sen S, Lee SW, Ouchi T (2004) BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. J Biol Chem. 279:19643–19648.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ. **Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia.** N Engl J Med 374: 2209–2221, 2016.
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, et al. **Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leucemia.** N Engl J Med 366(12): 1079-1089, 2012 doi: 10.1056/NEJMoa1112304.
- Payton M, Cheung HK, Ninniri MSS, Marinaccio C, Wayne WC, Hanestad K, Crispino JD, Juan G, Coxon A. **Dual targeting of aurora kinases with AMG 900 exhibits potente activity against acute myeloid leucemia with distinct post-mitotic outcomes.** Mol Cancer Ther 17(2): 2575-2585, 2018. doi: 10.1158/1535-7163
- Petretti C, Savoian M, Montembault E, Glover DM, Prigent C, Giet R. **The PITSLRE/ CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation.** EMBO Rep, 7: 418–424, 2006.
- Pippa R e Odero MD. **Importance of genetics in acute myeloid leukemia.** An Sist Sanit Navar 37(3): 429:434, 2014. doi: 10.4321/s1137-66272014000300011
- Pitts TM, Davis SL, Eckhardt SG, Bradshaw-Pierce EL. **Targeting nuclear kinases in cancer: development of cell cycle kinase inhibitors.** Pharmacol Ther 142(2):258-269, 2014 doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.010
- Port M, Bottcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J, Neumann A, Pouryamout L. **Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis.** Ann Hematol 93(8): 1279-1286, 2014 doi: 10.1007/s00277-014-2072-6
- Portella G, Passaro C, Chieffi P. **Aurora B. a new prognostic marker and therapeutic target in cancer.** Curr Med Chem. 18:482–496, 2011
- Qi J, Gao X, Zhong X, Zhang N, Wang R, Zhang H, Pan T, Liuc X, Yao Y, Wu Q, Niu M, Xu K. **Selective inhibition of Aurora A and B kinases effectively induces cell cycle arrest in t(8;21) acute myeloid leukemia.** Biomed Pharmacother 117: 109-113. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109113.
- Rego EM. **Molecular basis of Acute Myelogenous Leukemia.** Rev. Bras. Hematol, 2009 Hemoter 24(3):160-165, 2002), 2002.

- Ribeiro AF, Pratorcorona M, Erpelinck-Verschueren C et al. **Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid Leukemia** *Blood*, vol. 119, no. 24, pp. 5824–5831, 2012.
- Righes CS, Garcia DVO, Silva PC, Almeida EL, Pellegrin JC. **Avaliação epidemiológica, hematológica e imunofenotípica de pacientes adultos portadores de leucemia aguda diagnosticados no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul**, Brasil. *Rev. Bras. Análises Clínicas*, 2017 doi: 10.21877/2448-3877.201700569.
- Rollig C, Bornhauser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, Aulitzky W, Bodenstein H, Tischler HJ, Stuhlmann R, et al. **Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system.** *J Clin Oncol* 29(20): 2758–2765, 2011 doi: 10.1200/JCO.2010.32.8500
- Rose-Inman H e Kuehl D. **Acute leukemia.** *Emerg Med Clin North Am* 32(3):579-596, 2014. doi: 10.1016/j.emc.2014.04.004.
- Rubin E, Shapiro G, Stein M, et al. **A phase I clinical and pharmacokinetic (PK) trial of the aurora kinase (AK) inhibitor MK-0457 in cancer patients** [abstract 3009]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 4:123s, 2006.
- Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva LRJ, Graça CHN, Ferreira E, Hamerschlak N, Guerra JCC, Bacal NS, Andrade JAD, Borovik CL. **Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH).** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 27(2): 94-101, 2005
- Sanders MA e Valk PJ. **The evolving molecular genetic landscape in acute myeloid leukaemia.** *Curr Opin Hematol* 20(2): 79-85, 2013 doi: 10.1097/MOH.0b013e32835d821c
- Saultz JN e Garzon R. **Acute myeloid leukemia: a concise review.** *J Clin Med* 5(3): E33, 2016 doi: 10.3390/jcm5030033.
- Schlenk RF, Benner A, Krauter J, Buchner T, Sauerland C, Ehninger G, Schaich M, Mohr B, Niederwieser D, Krahl R, et al. **Individual Patient Data–Based Meta-Analysis of Patients Aged 16 to 60 Years With Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup.** *J Clin Oncol* 22(18): 3741-3750, 2004 doi: 10.1200/JCO.2004.03.012
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. **Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.** *N Engl J Med* 358: 1909-1918, 2008 doi: 10.1056/NEJMoa074306.
- Schneider V, Egenrieder S, Gotz M, Herbst C, Greiner J, Hofmann S. **Specific immune responses against epitopes derived from Aurora kinase A and B in acute myeloid leukemia.** *Leuk Lymphoma* 54(7): 1500-1504, 2013. doi: 10.3109/10428194.2012.740667.
- Seldin D, Sloan M. **Approach to the Patient with Benign Hematologic Disorders, SAM.** Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/7607/abordagem_aos_pacientes_com_disturbios_hematologicos_benignos.htm. Acesso em: 25 de jul de 2020, 2015

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. **Cancer statistics, 2020**. *CA Cancer J Clin* 69:7–34, 2020
- Stenoien DL, Sen S, Mancini MA, Brinkley BR. **Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle**. *Cell Motil Cytoskeleton* 55: 134–146, 2003
- Stölzel F, Mohr B, Kramer M, Oelschlägel U, Bochtler T, Berdel WE, Kaufmann M, Baldus CD, Schäfer-Eckart K, Stuhlmann R, et al. **Karyotype complexity and prognosis in acute myeloid leukemia**. *Blood Cancer J* 6:e386. doi: 10.1038/bcj.2015.114, 2016
- Strickland SA, Sun Z, Ketterling RP, Cherry AM, Cripe LD, Dewald G, Fernandez HF, Hicks GA, Higgins RR, Lazarus HM, et al. **Independent Prognostic Significance of Monosomy 17 and Impact of Karyotype Complexity in Monosomal Karyotype/Complex Karyotype Acute Myeloid Leukemia: Results from Four ECOG-ACRIN Prospective Therapeutic Trials**. *Leuk Res* 59:55-64, 2017 doi: 10.1016/j.leukres.2017.05.010.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. **A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes**. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6062–6067, 2014. doi: 10.1073/pnas.0400782101
- Stenoien DL, Sen S, Mancini MA, Brinkley BR. **Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle**. *Cell Motil Cytoskeleton* 55: 134–146, 2003
- Sugimoto K, Urano T, Zushi H, Inoue K, Tasaka H, Tachibana M, Dotsu M. **Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importin alpha**. *Cell Struct Funct.* 27:457–67, 2002
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4^a edição. IARC Press, Lyon, 110–141p, 2008.
- Takeshita M, Koga T, Takayama K, Ijichi K, Yano T, Maehara Y, Nakanishi Y, Sueishi K. **Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer**. *Lung Cancer*,80: 85-90, 2013. doi: 10.1016/j.lungcan.2012.
- Tallman MS, Wang ES, Altman JK, Appelbaum FR, Bhatt VR, Bixby D, Coutre SE, De Lima M, Fathi AT, Fiorella M, et al. **Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology**. *J Natl Compr Canc Netw* 17(6):721-749, 2019 doi: 10.6004/jnccn.2019.0028.
- Tang A, Gao K, Chu L, Zhang R, Yang J, Zheng J. **Aurora kinases: novel therapy targets in cancers**. *Oncotarget*, 8(14): 23937-23954, 2017. doi:10.18632/oncotarget.14893.
- Terada Y. **Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis**. *Cell Struct Funct* 26: 653–657, 2001
- Toji S, Yabuta N, Hosomi T, Nishihara S, Kobayashi T, Suzuki S, Tamai K, Nojima H. **The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase**. *Genes Cells* 9: 383–397, 2004.
- Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. **The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge**. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19: A68–A77, 2015. DOI: 10.5114/wo.2014.47136
- Torchia EC, Zhang L, Huebner AJ, Sen S, Roop DR. **Aurora kinase-A deficiency during skin development impairs cell division and stratification**. *J Invest*

- Dermatol 133: 78–86, 2013
- Toughiri R, Li X, Du Q e Bieberich CJ. **Phosphorylation of NuMA by Aurora-A kinase in PC-3 prostate cancer cells affects proliferation, survival, and interphase NuMA localization.** J Cell Biochem. 114(4):823-830, 2013
- Traynor AM, Hewitt M, Liu G, Flaherty KT, Clark J, Freedman SJ, Scott BB, Leighton AM, Watson PA, Zhao B, O'Dwyer PJ, Wilding G. **Phase I dose escalation study of MK-0457, a novel Aurora kinase inhibitor, in adult patients with advanced solid tumors.** Cancer Chemother Pharmacol 67(2):305-14. doi: 10.1007/s00280-010-1318-9, 2010
- Tsou JH, Chang KC, Chang-Liao PY, Yang ST, Lee CT, Chen YP, Lee YC, Lin BW, Lee JC, Shen MR, Chuang CK, Chang WC, Wang JM and Hung LY. **Aberrantly expressed AURKC enhances the transformation and tumourigenicity of epithelial cells.** J Pathol 225:243–254,2011
- Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, Long N, Schultz AR, Traer E, Abel M, et al. **Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia.** Nature 562(7728):526-531, 2018 doi: 10.1038/s41586-018-0623-z.
- Uehara R, Tsukada Y, Kamasaki T, Poser I, Yoda K, Gerlich DW, Goshima G. **Aurora B and Kif2A control microtubule length for assembly of a functional central spindle during anaphase.** J Cell Biol. 202:623–36, 2013.
- Ulisse S, Delcros JG, Baldini E, Toller M, Curcio F, Giacomelli L, Prigent C, Ambesi-Impimbatto FS, D'Armiento M, ArlotBonnemains Y. **Expression of Aurora kinases in human thyroid carcinoma cell lines and tissues.** Int J Cancer.119(2): 275–82, 2006
- Vagnarelli P, Earnshaw WC. **Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events.** Chromosoma 113: 211–222, 2004
- Vardiman JW1, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** Blood 114(5):937-51, 2009 doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
- Velloso EDRP, Motta CHAS, Furtado JB, Bacal NS, Silveira PAA, Moyses CB, Sitnik R e Pinho JRR. **Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies.** Einstein 9:184-189, 2011
- Wang Q, Stacy T, Miller JD, Lewis AF, Gu TL, Huang X, Bushweller JH, Bories JC, Alt FW, Ryan G, et al. **The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo.** Cell, 87:697, 1996
- Weaver BA, Cleveland DW. **Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death.** Cancer Cell 8:7–12, 2005
- Wysong DR, Chakravarty A, Hoar K, Ecsedy JA. **The inhibition of Aurora A abrogates the mitotic delay induced by microtubule perturbing agents.** Cell Cycle 8: 876–888, 2009
- Yamauchi T, Negoro E, Lee S, Takai M, Matsuda Y, Takagi K, Kishi S, Tai K, Hosono N, Tasaki T, et al. **A high serum uric acid level is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia.** Anticancer Res 33:3947–3951, 2013
- Yanada M, Matsuo K, Emi N e Naoe T. **Efficacy of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Depends on Cytogenetic Risk for Acute**

- Myeloid Leukemia in First Disease Remission.** *Cancer* 103: 1652-1658, 2005
- Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, Komatsu N, Bandobashi K, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H, Yokoyama A, **AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo.** *Blood* 110: 2034–2040, 2007
- Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Nobumoto A, Udaka K, Yokoyama A. **CD34 /CD38 acute myelogenous leukemia cells aberrantly express Aurora kinase A.** *Int J Cancer* 133: 2706–2719, 2013
- Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Udaka K, Yokoyama A. **Bcr-Abl activates AURKA and AURKB in chronic myeloid leukemia cells via AKT signaling.** *Int J Cancer.* 34(5):1183-94, 2014
- Yazarloo F, Shirkoohi R, Mobasher MB, Emami A, Modarressi MH. **Expression analysis of four testis-specific genes AURKC, OIP5, PIWIL2 and TAF7L in acute myeloid leukemia: a gender-dependent expression pattern.** *Medical Oncology*, 30(1), 2013. doi:10.1007/s12032-012
- Ye D, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Xiao L, Vadhan-Raj S, Fernandez MH, Nguyen MH, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. **Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia.** *J Hematop* 2: 2–8, 2009
- Zekri A, Lesan V, Ghaffari SH, Tabrizi MH, Modarressi MH. **Gene amplification and overexpression of Aurora-C in breast and prostate cancer cell lines.** *Oncol Res.* 20:241–50, 2012
- Zemanova Z, Michalova K, Buryova H, Brezinova J, Kostylkova K, Bystricka D, Novakova M, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, et al. **Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis,** *Leuk. Res.* 38(5):537–544, 2014
- Zheng FM, Long ZJ, Hou ZJ, Luo Y, Xu LZ, Xia JL, Lai XJ, Liu JW, Wang X, Kamran M, et al. **A novel small molecule aurora kinase inhibitor attenuates breast tumor-initiating cells and overcomes drug resistance.** *Mol Cancer Ther.* 13(8):1991-2003, 2014
- Zheng F, Yue C, Li G, He B, Cheng W, Wang X, Yan M, Long Z, Qiu W, Yuan Z, et al **Nuclear AURKA acquires kinaseindependent transactivating function to enhance breast cancer stem cell phenotype.** *Nat Commun.* 7:10180, 2016
- Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. **Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation.** *Nat Genet* 20: 189–193, 1998.

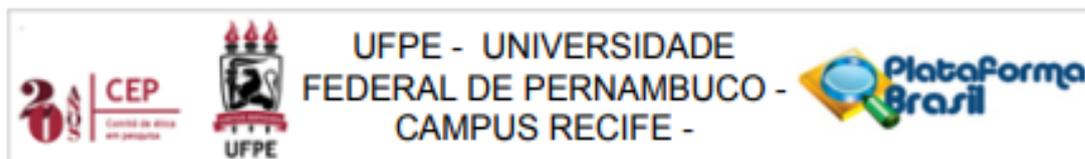
APÊNDICE A – TABELA SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1: Cariótipos dos pacientes da coorte Recife.

Cariótipo	Grupo de cariótipo	Nº de pacientes
46,XY[20]	CN	25
46,XX[20]	CN	10
48,XX,t(4;6)(p14;q?),+16,+21,t(4;20)(p13;q11)[20]	CC	01
46,XY,del(7)(q21),t(7;16)(p15;q23),inv(12)(p13;q24.1)[20]	CC	01
CC	CC	01
46,XY,t(8;21)(q22;q22)[20]	t/inv	03
46,XX,t(8;21)(q22;q22)[20]	t/inv	04
46,XY,t(5;11)(q35;p13)[20]	t/inv	01
46,XX,inv(16)(p13;q22)[20]	t/inv	01
46,XX,t(4;17)(p14;q12),t(9;22)(q32;q11)[20]	t/inv	01
46,XY,t(8;21)(q22;q22),inv(9)(q12.q13)[20]	t/inv	01
46,XY,t(7;13)(q22;q34)[20]	t/inv	01
46,XX,t(2;10)(q?p?),-7,+18[20]	CC	01
46,XY,t(3;11)(p25;p15)[20]	t/inv	01
46,XX,del(11)(q23)[20]	add/del	01
46,XX,del(5)(q31;q35)[20]	add/del	01
43~46,XX,del(5q)(q12;q13),-18,-19,-20,-22[20]	CC	01
47,XY,+4[20]	add/del	01
47,XY,+8[20]	add/del	01
48,XY,+8,+8[20]	add/del	01
45,XX,-7[20]	add/del	01
47,XY,del(2)(p13),-5,+8,add(9)(q34),-12,-13,-17,+21,+3mar[20]	CC	01
47,XX,+11[20]	add/del	01
47,XY,+8[20]	add/del	01
81-92,XXXX,t(9;22)(q34;q11)x2[20]	CC	01
47,XY,-5,del(7)(q22q34),del(17)(p13),+mar[20]	CC	01
45,XY,der(17)t(17;18)(p11.2;?),-18[20]	CC	01
44,XX,-4,del(5)(q12q33),dic(7;18)(q36;q23),-18,-22[20]	CC	01
47,XY,+8,del(20)(q11)[20]	add/del	01
44,X,-	CC	01
X,add(1)(p36),+6,del(6)(q?),t(11;?)(p11.2;?),del(12)(p11.2),-13,-13,-17,+mar[20]		
46,XX,del(1)(q41),t(9;22)(q34;q11),del(17)(p11.2)[20]	CC	01
Total	69	69

ANEXO A – PARECERES DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Parecer 1: Parecer de aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AURKA, AURKB E AURKC EM PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Pesquisador: AIDA MAYRA GUEDES DE ANDRADE

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 02870318.5.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.251.870

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda para simples alteração em um dos protocolos de coleta de material (sangue periférico ou medula óssea). A alteração consiste basicamente em aumentar as quantidades de sangue periférico ou de medula óssea coletadas de 4 ml para 8 ml e de 5 ml para 10 ml, respectivamente. A medula será obtida do aspirado de medula óssea dos pacientes que já estão sendo coletados para realização do exame "mielograma", indicado para esclarecimento de citopenias, portanto, o paciente não será exposto a riscos adicionais àqueles intrínsecos aos procedimentos padrões. Esta modificação se deve ao fato da rápida coagulação das amostras de medula óssea obtidas por procedimento cirúrgico da crista ilíaca. Reitera-se que todos os procedimentos para coleta das amostras serão realizados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco, cuja carta de anuência encontrasse anexada a plataforma brasil. Assim sendo o projeto de pesquisa da Estudante AIDA MAYRA GUEDES DE ANDRADE orientanda do Professor ANTONIO ROBERTO LUCENA DE ARAUJO vinculado ao Programa de Pós-graduação em Genética 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 Cancer de Pernambuco, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Fundação de Hematologia e

Parecer 2: Parecer de aprovação 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: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AURKA, AURKB E AURKC EM PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Pesquisador: AIDA MAYRA GUEDES DE ANDRADE

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 02870318.5.3003.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.337.819

Apresentação do Projeto:

Considerando as alterações citogenéticas no diagnóstico como o principal fator prognóstico independente na LMA e que o comprometimento da função das Aurks pode causar instabilidade cromossômica, é teoricamente possível que a expressão e/ou amplificação dos genes AURKA, AURKB e AURKC possam estar diretamente associados com alterações cromossômicas, principalmente estruturais.

Objetivo da Pesquisa:

4.1. Objetivo Primário

Associar a expressão dos genes AURKA, AURKB e AURKC com alterações cromossômicas (estruturais e numéricas) ao diagnóstico e desfecho clínico de pacientes adultos com leucemia mielóide aguda.

4.2. Objetivos Secundários

Determinar as alterações cromossômicas (estruturais e numéricas) ao diagnóstico de pacientes adultos com leucemia mielóide aguda e categorizá-los em grupos de risco (favorável, intermediário e desfavorável), seguindo as recomendações do grupo European LeukemiaNet (ELN);

Determinar a expressão relativa dos genes AURKA, AURKB e AURKC em amostras de medula óssea de pacientes adultos com leucemia mielóide

Parecer 3: Parecer de aprovação do comitê de ética da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Hemope).

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AURKA, AURKB E AURKC EM PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Pesquisador: AIDA MAYRA GUEDES DE ANDRADE

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 02870318.5.3001.5195

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.402.769

Apresentação do Projeto:

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença clonal da medula óssea que afeta progenitores hematopoiéticos, tornando-os incapazes de se diferenciarem terminalmente e de responderem aos reguladores naturais de proliferação e morte celular. Ela é uma doença bastante heterogênea no que diz respeito à sua biologia e à resposta ao tratamento, dessa forma, o estudo de marcadores genéticos, de achados citogenéticos e de seu impacto no prognóstico permite o desenvolvimento de abordagens terapêuticas adaptadas ao risco, cujas chances de sucesso e cura são potencialmente maiores. Nesse contexto, alterações citogenéticas ao diagnóstico constituem o principal fator prognóstico independente da LMA. Em 15% a 20% dos pacientes, é observado cariótipo complexo. A organização EuropeanLeukemiaNet (ELN) classifica pacientes com LMA de acordo com seu prognóstico em grupos de risco favoráveis, intermediários e desfavoráveis, fornecendo ferramentas importantes para a conduta terapêutica desses pacientes. Alguns trabalhos mostram que expressão aberrante de proteínas responsáveis pela formação do fuso mitotótico e centrômero possam estar envolvidas neste processo. Nesse sentido, as auroras quinases (Aurk) desempenham papel fundamental na regulação da mitose e controle da citocinese,

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa “Avaliação da expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* em pacientes adultos com leucemia mielóide aguda”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Aida Mayra Guedes de Andrade, residente a Rua Quarenta e Oito, número 462, Espinheiro CEP: 52020-060, telefone: (81) 999748622, email: aidamgandrade@gmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Antonio Roberto Lucena de Araujo (81- 999089382), Marcos André Cavalcanti Bezerra (81-998008105), Aleide Santos de Melo Lima (81-988358596), Matheus Filgueira Bezerra (81-998734248), Fábio Rodrigo Barbosa Dutra Nascimento (81-988612131), Manuela Freire Hazin Costa (81-988289558), Marinus de Moraes Lima (81-995741797) e Reijane Alves de Assis (81-996490639).

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Essa pesquisa tem como objetivo “associar a expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* (partes do DNA que produzem partículas conhecidas como RNAs e proteínas para que o corpo funcione bem) com alterações cromossômicas (estruturais e numéricas) ao diagnóstico e desfecho clínico de pacientes adultos com leucemia mielóide aguda”. Serão incluídos na pesquisa pacientes adultos (acima de 18 anos) com diagnóstico de LMA (um tipo de leucemia), atendidos e acompanhados no Hospital Hemope e no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP). O material a ser analisado na pesquisa será de medula óssea (tutano) e/ou sangue periférico (sangue retirado das veias do braço). Essas amostras são coletadas de rotina no momento do diagnóstico e só utilizaremos na pesquisa o material que sobrar dessas análises, não sendo necessária nenhuma coleta adicional, evitando transtornos ao paciente. A pesquisa não pretende modificar o tratamento ou acompanhamento já preconizado (estabelecido) para o paciente.

Essa pesquisa não traz riscos adicionais para o paciente, além dos riscos que são intrínsecos próprios) aos procedimentos que já seriam realizados na rotina de diagnóstico, pois o seu material biológico será o mesmo utilizado na rotina laboratorial do HCP e Hospital Hemope e será encaminhado para a pesquisa somente após seu uso na rotina, sendo utilizado apenas o material que sobrar. Em nenhuma ocasião será coletado material excedente para uso da pesquisa. Pode haver, apenas, risco de constrangimento pela exposição dos dados, que será minimizado com o rigoroso controle das informações pelo pesquisador principal.

Com essa pesquisa pretendemos, futuramente, melhorar o entendimento sobre o desenvolvimento da LMA e o refinamento da análise de prognóstico (classificação de risco) e, assim, poderá haver uma maior adequação do protocolo de tratamento a ser seguido para cada paciente, podendo aumentar as chances de cura.

Apesar de a pesquisa de algumas destas mutações serem preconizadas pela Organização Mundial da Saúde, o alto custo destes exames muitas vezes não permite sua realização nas instituições públicas ou por custeio próprio do paciente. Nesse contexto, esse projeto se propõe a realizar os testes em questão e fornecer os resultados à equipe dos hospitais envolvidos e aos pacientes.

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

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, por parte dos pesquisadores, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br**).

Aida Mayra Guedes de Andrade
Pesquisador responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Avaliação da expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* em pacientes adultos com leucemia mielóide aguda”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante:

Impressão
digital
(opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Aida Mayra Guedes de Andrade

Dados pessoais

Filiação Edmundo Joaquim de Andrade e Juely Guedes Pereira de Andrade

Nascimento 04/07/1995 - Brasil

Formação acadêmica/titulação

- 2018** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AURKA, AURKB E AURKC EM PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA
Orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- 2013 - 2017** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: ANÁLISE DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS: UM ESTUDO DE EXPOSIÇÃO PARCIAL À RAIOS X
Orientador: Dra. Fabiana Farias de Lima

Formação complementar

- 2019-2019** Curso de PCR Quantitativa em Tempo Real. (Carga horária: 50h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MENDES, MARIANA E. ; MENDONÇA, JULYANNE C. G. ; BARQUINERO, JOAN F. ; HIGUERAS, MANUEL ; GONZALEZ, JORGE E. ; **ANDRADE, AIDA M. G.** ; SILVA, LAÍS M. ; NASCIMENTO, ALYNE M. S. ; LIMA, JULIANNE C. F. ; SILVA, JÚLIO C. G. ; HWANG, SUY ; MELO, ANA M. M. A. ; SANTOS, NEIDE ; LIMA, FABIANA F. . Comparative study of micronucleus assays and dicentric plus ring chromosomes for dose assessment in particular cases of partial-body exposure. INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, v. 95, p. 1-14, 2019.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. NASCIMENTO, F. R. B. D. ; FRANCA NETO, P. L. ; ARAUJO, G. V. S. ; **ANDRADE, AIDA M. G.** ; SILVA, J. L. C. ; ARAUJO, A. S. ; BEZERA, M. A. C. ; LUCENA-ARAÚJO, A. R. . Avaliação clínica dos polimorfismos MMP2 rs243865 e MMP9 rs17576 em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 2019. v. 41.
2. LIMA, A. S. M. ; SANTOS, B. L. ; BEZERRA, M. F. ; FRANCA NETO, P. L. ; **ANDRADE, AIDA M. G.** ; SILVA, J. B. R. ; Santana, L.M.B. ; SILVA, E. M. G. ; BEZERRA, M. A. C. ; LUCENA-ARAÚJO, A. R. . ID1 gene expression and its impact on the outcome of AML patients. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 2019. v. 41.
3. BEZERRA, M. F. ; LIMA, A. S. M. ; **ANDRADE, AIDA M. G.** ; OLIVEIRA, M. M. ; REGO, E. M. ; ASSIS, R. A. ; BELTRAO, E. I. C. ; BEZERA, M. A. C. ; LUCENA-ARAÚJO, A. R. . CO-OCCURRENCE OF DNMT3A-R882, FLT3 AND NPM1 MUTATIONS IDENTIFIES A SUBSET OF AML PATIENTS WITH ADVERSE PROGNOSIS. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**., 2019. v. 41.
4. ARCANJO, G. S. ; BATISTA, J. V. G. F. ; OLIVEIRA, J. M. F. ; DOMINGOS, I. F. ; ARAUJO, A. B. S. ; **ANDRADE, AIDA M. G.** ; ANJOS, A. C. ; ARAUJO, A. S. ; LUCENA-ARAÚJO, A. R. ; BEZERRA, M. A. C. . VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND SICKLE CELL ANEMIA SEVERITY. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 2019. v. 41.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **DE ANDRADE, A. M. G.. Leucemias Agudas.** 2020. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. **ANDRADE, AIDA M. G.. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AURKA, AURKB E AURKC EM PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA.** 2019. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

Eventos

Participação em Eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no (a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO**, 2019. ID1 gene expression and its impact on the outcome of AML patients. (Congresso).
2. Apresentação de Poster / Painel no (a) **I Encontro de Biociências da**

Universidade Federal de Pernambuco, 2019. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AURKA, AURKB E AURKC EM PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA. 2019. (Encontro).

3. Apresentação de Poster / Painel no (a) **VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2018. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AURKA, AURKB E AURKC EM PACIENTES ADULTOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA. (Outra).

Organização de Evento

1. **DE ANDRADE, A. M. G.. VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética**. 2018. (Outro).