



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

INTERFERÊNCIA DE VARIANTES GÊNICAS NO RISCO DO DESENVOLVIMENTO  
DE PANCREATITE DURANTE O TRATAMENTO DE LLA COM PEG  
ASPARAGINASE

LUCAS BRABO ROTELLA

BELÉM-PA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

INTERFERÊNCIA DE VARIANTES GÊNICAS NO RISCO DO DESENVOLVIMENTO  
DE PANCREATITE DURANTE O TRATAMENTO DE LLA COM PEG  
ASPARAGINASE

LUCAS BRABO ROTELLA

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação de Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção de título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat.

BELÉM-PA

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
(CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da  
Universidade Federal do Pará**

**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

R843i Rotella, Lucas Brabo.

Interferência de Variantes Gênicas no Risco do  
Desenvolvimento de Pancreatite Durante o Tratamento de  
LLA Com PEG-Asparaginase / Lucas Brabo Rotella. —  
2022.

70 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. André Salim Khayat  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do  
Pará,

Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2022.

1. Leucemia Linfoide Aguda. 2. Pancreatite. 3.  
PEGasparaginase. I. Título.

CDD 599.935

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
INTERFERÊNCIA DE VARIANTES GÊNICAS NO RISCO DO DESENVOLVIMENTO  
DE PANCREATITE DURANTE O TRATAMENTO DE LLA COM PEG  
ASPARAGINASE

Banca Examinadora:

Dr. André Salim Khayat (UFPA)

**Orientador**

Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano (UFPA)

**Membro**

Dr. Joao Farias Guerreiro (UFPA)

**Membro**

Dr. Ana Virginia Soares Van Den Berg (UFPA)

**Membro**

Dr. Fernando Augusto Rodrigues Mello Junior (Hospital Ophir Loyola)

**Suplente**

BELÉM-PA

2022

*Dedico esta Dissertação de Mestrado à minha irmã Caroline Andrade Rotella Dantas. Suas gargalhadas e brincadeiras, assim como seu sorriso e carinho irão viver eternamente em meu coração. Hoje, no Céu, cuida e intercede por nós. Espero lhe deixar orgulhosa por mais essa etapa concluída. A vida é um sopro e irei viver a minha buscando ser bom, para que amanhã, no Paraíso, eu possa esquecer o que significa saudade.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por todas as bênçãos recebidas, por sua infinita misericórdia em escutar minhas orações, por ser conforto nos momentos difíceis e providência na hora da necessidade, tendo a fé me sustentado em diversos momentos na estrada de mais essa etapa da minha carreira profissional.

À Universidade Federal do Pará e ao Núcleo de Pesquisas em Oncologia que com seus professores, estrutura e administração proporcionaram um ambiente fundamental para a formação, aquisição de conhecimento e produção científica, apesar das dificuldades da pandemia.

Ao Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela excelente estrutura disponibilizada para a realização deste projeto, além do auxílio, acolhimento e incentivo aos pesquisadores externos, como foi o meu caso.

Ao meu professor e orientador, André Salim Khayat, que sempre me incentivou e acreditou na minha capacidade, com sua famosa frase “eu sei que é complicado, mas eu peço isso porque sei que consegue”. O conhecimento científico recebido neste tempo sendo orientando tem um valor imensurável, porém é impossível não levar para a vida todas as lições diárias aprendidas ao lado deste admirável professor, pois além de ciência, ensina aos seus alunos, através de histórias e de seu zelo, como ser um excelente profissional, pesquisador, biomédico e a levar alegria a todos por meio de suas ações.

Às professoras Mariana Michalowski, Ciliana Rechenmacher e Daiane Cecconello, que abriram as portas para que esse trabalho fosse possível. Dedico a minha gratidão ao voto de confiança que me foi dado para tornar esse projeto realidade. Agradeço também todo acolhimento e suporte recebido durante os experimentos e reta final do mestrado, que este seja só o primeiro resultado de muitos outros que virão como fruto desta parceria.

Ao grupo do Núcleo de Pesquisas em Oncologia, por todos os momentos vividos, as dificuldades vencidas, os momentos em que nos ajudamos, as infinitas risadas que demos juntos, por cada momento de superação de experimentos dando errado, por todas as comemorações no auditório e por todas as amizades incríveis. Não há outro grupo no qual eu preferiria estar, graças a vocês, o caminho do mestrado se tornou prazeroso, leve, feliz e regado ao café.

À minha mãe, minha melhor amiga, que cuida, protege, ensina, apoia e incentiva. Obrigado por todo o esforço para me proporcionar tudo do bom e do melhor, para que eu pudesse me dedicar em tempo integral ao mestrado, por não me deixar desistir dos meus sonhos e por me dar o maior presente que eu poderia receber, a fé. Como a senhora sempre diz: a oração de mãe abala o Céu e eu tenho plena certeza que sem a sua oração incessante, nada disso seria possível.

Ao meu pai, que com seu jeito descontraído, sempre me deu apoio e me incentivou a buscar cada vez mais a solidez profissional. Apesar de suas tentativas para que passassem despercebidos, nunca deixei de reconhecer e ser grato pelos sacrifícios feitos para me ajudar a seguir a carreira científica, como as vezes que (por mais que eu não concorde, pois sempre vou me preocupar) ele zelou pelo meu foco evitando me deixar preocupado, um cuidado simples, mas com grande significado.

À minha irmã Ana Paula, pessoa que me ajuda e estimula a me divertir e curtir, mostrando que a vida não é só o trabalho/estudo, sendo importante estar com amigos e com a família também. Como irmã mais velha, sempre se preocupou e cuidou, com seu jeito objetivo e simples, que conforta o coração, pois sei que sempre poderei contar com ela, independentemente de onde eu esteja. Para mim, não há sentimento que expresse melhor o que é ser irmão.

À minha família, meu pilar, que possibilitou que eu alcançasse todas as conquistas recebidas, e também aquelas que ainda estão por vir. Minha fonte de confiança, pois quando o medo e a dúvida chegam, é por meio deles que retomo a coragem e a determinação. A família é o berço do amor, da felicidade em ver o próximo feliz e da solidariedade ao ver alguém triste, não tem um passo se quer que seja dado sem reconhecer e agradecer a presença dessa base em minha vida.

À minha namorada Karina Carvalho, que em meio as dificuldades da vida já superadas juntas, me ensinou a ser uma pessoa melhor, a aproveitar e valorizar cada momento e as coisas simples. Foi ao seu lado que descobri que a felicidade mora em um sorriso, em um abraço, em um sorvete durante a tarde ou em uma soneca no final de semana. O apoio e incentivo recebidos foram, são e sempre vão ser muito importantes para mim, em qualquer etapa da minha vida.

Ao grupo de pesquisas em leucemia, Eliel Barbosa, Marcelo Oliveira, Vitória Viana e Nayara Santos, a construção de conhecimento durante nossas conversas, experimentos e

apresentações foi de extrema importância para a minha formação na área da genética e oncologia, tendo sido um enorme prazer trabalhar com vocês.

Às minhas colegas de laboratório, Thaíssa Rodrigues, Sabrina Araújo e Monique Silva, que durante a fase experimental do experimento deste trabalho, forneceram uma enorme ajuda. Em meio a expedições no -80 °C e dezenas de tubos identificados, tornaram diversos momentos cansativos em momentos divertidos e ajudaram a superar o desespero de quando acidentes e falhas aconteciam.

Aos meus amigos em geral, que tornam a vida em uma verdadeira brincadeira, sendo meus irmãos de mães diferentes, meus conselheiros e confidentes. A magia de cativar e ser cativado por alguém e assim ganhar um eterno companheiro trouxe consigo a verdadeira felicidade em ver o próximo atingindo suas conquistas e em se sentir completo ao compartilhar as minhas, como a conclusão deste ciclo.

Por fim, agradeço aos integrantes da banca, por terem se disponibilizado para o enriquecimento deste trabalho, com suas considerações indispensáveis e fundamentais, acrescentando em minha formação um pedaço de suas histórias como verdadeiras referências em suas respectivas áreas.

Muito obrigado!

"Quando você nasceu, todos sorriam e você chorava; viva de modo que quando você morrer, todos chorem e você sorria"

(Confúcio)

## RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma patologia maligna dos linfoblastos B ou T caracterizada pela expansão clonal de células precursoras linfóides, sendo a neoplasia infantil mais frequente. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o triênio de 2020-2022 aproximadamente 10.800 novos casos de leucemias no Brasil. Ademais, somente na região Norte, para o ano de 2020, foram estimados aproximadamente 320 novos casos entre homens e mulheres. Para o tratamento de LLA, um dos principais e efetivo agente quimioterápico é a asparaginase (ASNase), demonstrando uma alta eficiência terapêutica, contudo, sua utilização demonstrou diversas complicações, como hipersensibilidade, hepatotoxicidade e desenvolvimento de pancreatite associada a asparaginase (PAA). Buscando reduzir os efeitos adversos, foi desenvolvida uma nova formulação, a PEG asparaginase (PEG ASNase), que demonstrou reduzir esses efeitos nocivos durante o tratamento, porém com oscilações interpessoais, tanto na eficiência quanto na adversidade dos efeitos. Variantes genéticas em *CPA2* (uma carboxipeptidase pancreática), *MYBBP1A* (co-repressor NF- $\kappa$ B), *RGS6* (regulador de sinalização da proteína G) e *ULK2* (regulador de autofagia de células do pâncreas) apresentam relação com a fisiologia das células pancreáticas, influenciando na resposta deste órgão frente ao tratamento por PEG ASNase, afetando a efetividade e favorecendo o desenvolvimento de pancreatite. Diante disso, este estudo buscou avaliar o impacto das variantes (rs199695765, rs3807342, rs3809849, rs17179470 e rs281366) neste grave efeito adverso, objetivando encontrar biomarcadores preditores de PAA e assim colaborar na modulação da conduta terapêutica dos pacientes com LLA. Ensaios *Taqman* para discriminação alélica foram realizados em 35 pacientes submetidos a terapia com PEG ASNase em um hospital de referência em oncopediatria nos Estados do Pará e Rio Grande do Sul. As associações entre genótipos e frequências alélicas com a PAA foram averiguadas por Exato de Fisher, Qui-quadrado e Odds Ratio ( $p \leq 0,05$ ). Nossos resultados apontaram uma associação entre os genótipos GT de *RGS6* e CT de *ULK2* com a PAA. Estas variantes gênicas podem colaborar nas decisões sobre o protocolo com uso de PEG ASNase, e assim auxiliar na redução da PAA em pacientes pediátricos com LLA.

**Palavras-Chave:** Leucemia linfóide aguda. PEG Asparaginase. Pancreatite.

## Abstract

Acute Lymphoid Leukemia (ALL) is a malignant pathology of B or T lymphoblasts characterized by the clonal expansion of lymphoid precursor cells, being the most frequent childhood neoplasm. The National Cancer Institute (INCA) estimated for the three-year period 2020-2022 approximately 10,800 new cases of leukemia in Brazil. Furthermore, in the North region alone, for the year 2020, approximately 320 new cases were estimated among men and women. For the treatment of ALL, one of the main and effective chemotherapeutic agents is asparaginase (ASNase), demonstrating a high therapeutic efficiency, however, its use has shown several complications, such as hypersensitivity, hepatotoxicity and the development of pancreatitis associated with asparaginase (AAP). Seeking to reduce adverse effects, a new formulation was developed, PEG asparaginase (PEG ASNase), which has been shown to reduce these harmful effects during treatment, but with interpersonal oscillations, both in efficiency and adverse effects. Genetic variants in *CPA2* (a pancreatic carboxypeptidase), *MYBBP1A* (NF- $\kappa$ B co-repressor), *RGS6* (G protein signaling regulator) and *ULK2* (pancreatic cell autophagy regulator) are related to the physiology of pancreatic cells, influencing in the response of this organ to PEG ASNase treatment, affecting the effectiveness and favoring the development of pancreatitis. Therefore, this study sought to evaluate the impact of the variants (rs199695765, rs3807342, rs3809849, rs17179470 and rs281366) on this serious adverse effect, aiming to find AAP predictive biomarkers and thus collaborate in modulating the therapeutic approach of patients with ALL. Taqman assays for allelic discrimination were performed in 35 patients undergoing therapy with PEG ASNase at a reference hospital in oncopediatrics in the States of Pará and Rio Grande do Sul. Associations between genotypes and allele frequencies with AAP were investigated by Fisher's Exact, Chi-square and Odds Ratio ( $p \leq 0.05$ ). Our results showed an association between the GT of *RGS6* and CT of *ULK2* genotypes with AAP. These gene variants can collaborate in decisions about the protocol with the use of PEG ASNase, and thus help to reduce AAP in pediatric patients with ALL.

Keywords: Acute lymphoid leukemia. PEG Asparaginase. Pancreatitis.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

<b>Figura 1 -</b>	Processo de hematopoese. CFU: unidade formadora de colônia; E: eritroide; Eo: Eosinófila; Baso: basófilo; GEMM: granulocítica, eritroide, monocítica e megacariocítica, GM: granulócito, monócito; Meg: megacariócito; NK: natural killer.	17
<b>Figura 2 -</b>	Número estimado de novos casos e mortes de 2020 a 2025 por leucemia, em ambos os sexos, idade de 0-85+.	18
<b>Figura 3 -</b>	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo para Brasil.	19
<b>Figura 4 -</b>	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo para a região Norte.	19
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática do citômetro de fluxo.	20
<b>Figura 6</b>	Células de paciente com LLA.	21
<b>Figura 7</b>	Visão Geral do tratamento de LLA	24
<b>Figura 8</b>	Mecanismo de ação da asparaginase em células normais e tumorais.	26
<b>Figura 9</b>	Diagnóstico e tratamento de PAA	28
<b>Figura 10</b>	Teste de “Odds Ratio” no programa Bioestat 5.0	42
<b>Quadro 1 -</b>	Classificação da Organização Mundial da Saúde para a Leucemias Linfoblásticas	22

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Ocorrência de PAA e das variantes dos genes *CPA2*, *MYBBPIA*, *RGS6* e *ULK2* em cada paciente. 37
- Tabela 2 - Sumarização do intervalo de confiança por meio do teste Clopper-Pearson. 38
- Tabela 3 - Testes de Exato de Fisher para correlação dos genótipos das variantes rs3809849 do gene *MYBBPIA* e rs3807342 do gene *CPA2* genes com a ocorrência de PAA. 39
- Tabela 4 - Testes de Exato de Fisher para correlação dos genótipos das variantes rs17179470 do gene *RGS6* e rs281366 do gene *ULK2* genes com a ocorrência de PAA. 39
- Tabela 5 - Testes de Exato de Fisher para correlação da frequência alélica das variantes rs3809849 do gene *MYBBPIA* e rs3807342 do gene *CPA2* com a ocorrência de PAA. 40
- Tabela 6 - Testes de Exato de Fisher para correlação de contagem de variantes com a ocorrência de PAA. 41
- Tabela 7 - Testes de Exato de Fisher para correlação da frequência alélica das variantes com a ocorrência de PAA. 41
- Tabela 8 - Testes de Exato de Fisher para correlação das variantes rs17179470 do gene *RGS6* e rs281366 do gene *ULK2* em conjunto com a ocorrência de PAA 42
- Tabela 9 - Frequência de cada variante analisada conforme a população de cada estudo 47

## LISTA DE SIGLAS

Asn	Asparagina
ASNase	Asparaginase
ASNS	Asparagina Sintetase
CID	Classificação Internacional de Doenças
CTHs	Células-tronco hematopoiéticas
DEP	<i>disheveled/Egl-10/pleckstrin</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GBD	Estudo Global de Carga de Doenças
GGL	Semelhante à proteína G gama
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HOIOL	Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
ILSG	<i>International Lymphoma Study Group</i>
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAA	Pancreatite associada à asparaginase
PEG ASNase	Peg asparaginase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase tempo real
<i>R.E.A.L</i>	<i>Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms</i>
RGS	Regulador da sinalização da proteína G
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDM	Monitoramento de drogas terapêuticas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Considerações Gerais das Leucemias</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Epidemiologia das Leucemias</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Diagnóstico de Leucemias</b>	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Leucemia Linfóide Aguda</b>	<b>21</b>
<b>1.5</b>	<b>Tratamento de LLA</b>	<b>23</b>
<b>1.6</b>	<b>Tratamento com Asparaginase</b>	<b>25</b>
<b>1.7</b>	<b>Pancreatite Associada à Asparaginase</b>	<b>26</b>
<b>1.8</b>	<b>PAA Associada a Fatores Genéticos</b>	<b>28</b>
1.8.1	Gene <i>CPA2</i>	28
1.8.2	Gene <i>MYBBP1A</i>	29
1.8.3	Gene <i>RGS6</i>	30
1.8.4	Gene <i>ULK2</i>	31
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Tipo de estudo e Amostragem</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Critérios de Inclusão</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Critérios de Exclusão</b>	<b>34</b>
<b>4.4</b>	<b>Aspectos Éticos</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>Extração de Material Genético</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Integridade das Amostras</b>	<b>35</b>
<b>4.7</b>	<b>Quantificação do Material Genético Extraído</b>	<b>35</b>
<b>4.8</b>	<b>PCR Qualitativo em Tempo Real</b>	<b>35</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise Estatística</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Discussão</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Conclusão</b>	<b>48</b>

	<b>Referências</b>	49
<b>ANEXO A</b>	<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	55
<b>ANEXO B</b>	<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA DO NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA</b>	58
<b>ANEXO C</b>	<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE</b>	64

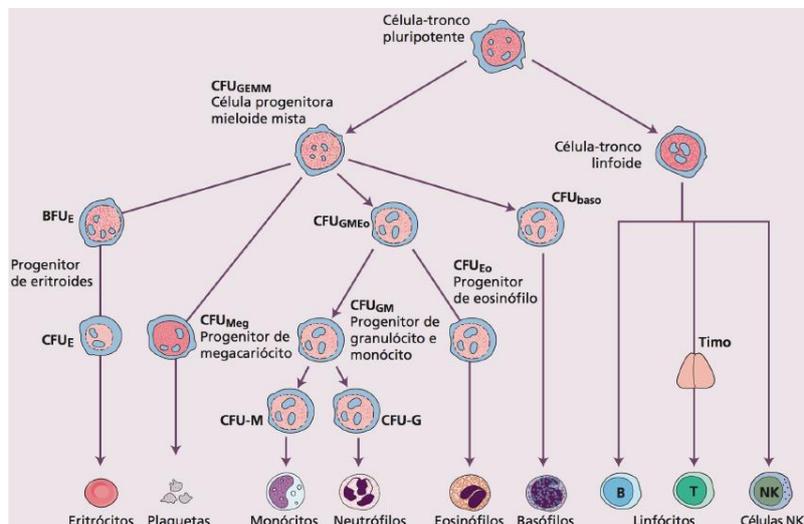
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais das Leucemias

O desenvolvimento de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) é um processo que consiste em várias etapas ordenadas e reguladas por um conjunto de fatores intrínsecos e do microambiente, chamado de “nicho”, que definem a diferenciação das CTHs. As leucemias são distúrbios hematológicos resultados da desregulação dessa diferenciação celular, causando um aumento anormal dos precursores das séries mieloide ou linfoide. Além disso, nas leucemias, ocorre um processo de seleção e dominância das células mutantes durante a competição por recursos de nicho, gerando nichos anormais na medula óssea, que estão relacionados a patologia da doença. (ENCISO; MENDOZA; PELAYO, 2015).

Sendo assim, as leucemias envolvem um grupo de malignidades que acometem as CTHs, caracterizadas por um elevado número de leucócitos no sangue periférico e/ou medula óssea, que ocorre devido a expansão clonal dos blastos, células imaturas do processo de hematopoiese, demonstradas na figura 1 (JULIUSSON; HOUGH, 2016). Estas malignidades apresentam etiologias, características clínicas e tratamento divergentes. Com base nestes fatores e no comprometimento da linhagem celular, as leucemias são classificadas, de forma geral, em quatro grupos principais: leucemia linfoide aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC) (YAMAMOTO; GOODMAN, 2008).

Figura 1 - Processo de hematopoiese. CFU: unidade formadora de colônia; E: eritroide; Eo: Eosinófila; Baso: basófilo; GEMM: granulocítica, eritroide, monocítica e megacariocítica, GM: granulócito, monócito; Meg: megacariócito; NK: natural killer.

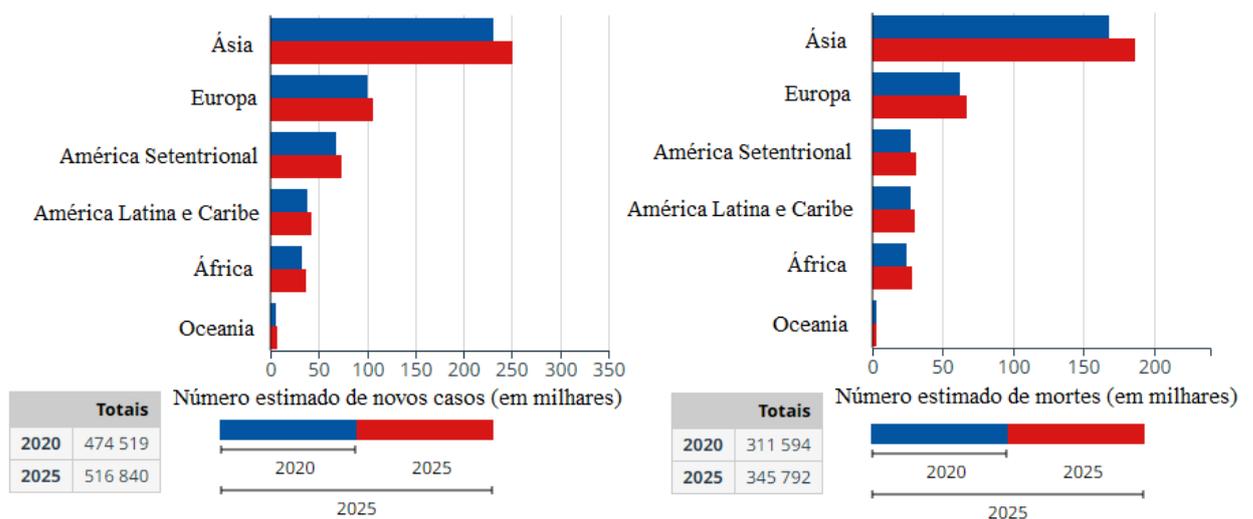


Fonte: HOFFBRAND; MOSS, 2013.

## 1.2 Epidemiologia das Leucemias

As leucemias são o tipo de câncer mais frequente em crianças, representando aproximadamente um terço dos cânceres infantis, e sua incidência aumentou nas últimas décadas (MEZEI *et al.*, 2014). Esse aumento é perceptível por meio da base de dados GLOBOCAN e também ocorre em relação a mortalidade, visto que, em 2018, as leucemias corresponderam a 437.033 dos casos de incidência e 309.006 dos casos de morte por câncer mundialmente, enquanto que no ano de 2020, esses números foram de 474.519 novos casos e 311.594 casos de morte (BRAY *et al.*, 2018; SUNG *et al.*, 2021). As estimativas feitas para o ano de 2025 (Figura 2) pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), mostram que essas taxas continuarão aumentando (IARC, 2022).

Figura 2 – Número estimado de novos casos e mortes de 2020 a 2025 por leucemia, em ambos os sexos, idade de 0-85+.



Fonte: IARC, 2022 (adaptado).

O Estudo Global de Carga de Doenças (GBD) do *Institute for Health Metrics and Evaluation* produz estimativas utilizando diversas fontes adicionais e, com base nesse grupo, houve um aumento superior a 25% do número total de casos de leucemia global no período de 2005 a 2015 (BISPO; PINHEIRO; KOBETZ, 2020).

Além das estimativas, a IARC também realiza a classificação de 185 países através do índice de desenvolvimento humano (IDH), com o objetivo de enriquecer os dados. Em 2018, houve uma incidência e mortalidade por leucemia substancialmente superior nos países mais desenvolvidos, visto que a comparação de IDH alto/muito alto com IDH médio/baixo apresentou os respectivos valores de aproximadamente 1,8 vezes superior a cada 100.000 habitantes e acima de 1,2 vezes superior a cada 100.000 habitantes, tanto para homens quanto

para mulheres (BRAY *et al.*, 2018). Em 2020 esses valores aumentaram para aproximadamente 2,0 vezes superior a cada 100.000 habitantes em incidência e 1,3 vezes superior a cada 100.000 habitantes em mortalidade (IARC, 2022). Os dados também demonstraram em 2018 que, globalmente, houve uma maior incidência (6,1 x 4,3 por 100.000) e morte (4,2 x 2,8 por 100.000) nos homens em relação às mulheres. Essa tendência em relação ao sexo se manteve nos dados levantados pelo GLOBOCAN em 2020, sendo as taxas de incidência 6,9 x 4,5 por 100.000 habitantes e mortalidade 4,0 x 2,7 por 100.000 habitantes (BRAY *et al.*, 2018; SIEGEL *et al.*, 2022).

No Brasil, a leucemia é o décimo tipo de câncer mais incidente, tendo apresentando no ano de 2017 um total de 9.196 óbitos: 4.795 homens e 4.401 mulheres, respectivamente. As estimativas para o país (figura 3) são, para cada ano do triênio 2020-2022, de 5.920 novos casos em homens e 4.890 em mulheres. Considerando a região Norte (figura 4) do país, há um elevado índice de casos, sendo a leucemia o quinto câncer mais frequente em homens (4,45/100 mil) e sexto em mulheres (3,35/100 mil). Para a cidade de Belém, a estimativa para o ano 2020 foi de 320 novos casos (INCA, 2019).

Figura 3 - Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo para Brasil.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2019.

Figura 4 – Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo para a região Norte.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.770	28,7%	Homens	Mulheres	Mama feminina	1.970	21,0%
Estômago	1.110	11,5%			Colo do útero	1.940	20,6%
Traqueia, brônquio e pulmão	870	9,0%			Cólon e reto	590	6,3%
Cólon e reto	490	5,1%			Traqueia, brônquio e pulmão	590	6,3%
Leucemias	410	4,2%			Estômago	550	5,9%
Cavidade oral	340	3,5%			Leucemias	320	3,4%
Sistema nervoso central	300	3,1%			Sistema nervoso central	280	3,0%
Esôfago	250	2,6%			Ovário	310	3,3%
Laringe	240	2,5%			Glândula tireoide	260	2,8%
Linfoma não Hodgkin	210	2,2%			Corpo do útero	230	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

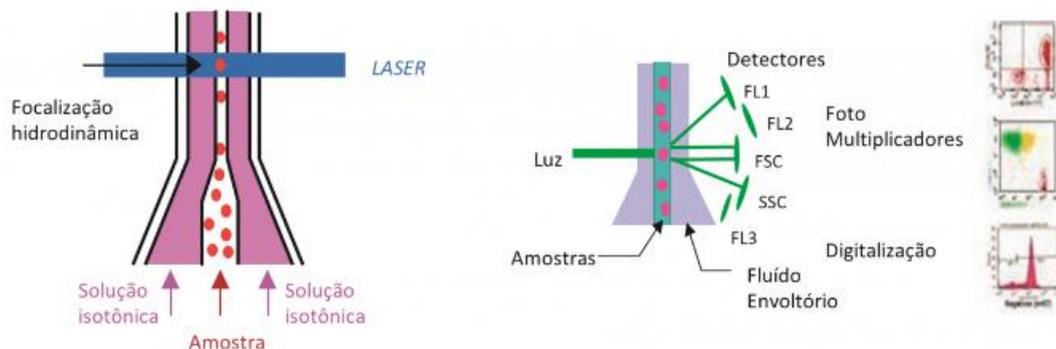
Fonte: INCA, 2019.

### 1.3 Diagnóstico de Leucemias

Os sintomas mais frequentes das leucemias resultam da proliferação clonal de blastos leucêmicos na medula óssea, impedindo a produção normal de eritrócitos, da série branca e plaquetas, sendo comum anemia, trombocitopenia e neutropenia com graus variáveis. Sendo assim, o hemograma é normalmente o primeiro exame a evidenciar as alterações morfológicas. Ademais, a medula óssea produz diversos tipos celulares e uma citopenia reflete função deficiente da medula ou destruição periférica da célula envolvida. A maioria dos pacientes com leucemia apresenta mais de uma alteração hematológica quantitativa no momento do diagnóstico, dessa forma é recomendada a investigação deste tipo de quadro. Para o diagnóstico definitivo é necessário o mielograma, porém, dependendo do perfil de celularidade no sangue circulante periférico, o diagnóstico também pode ser feito deste material (KAPLAN, 2019).

O diagnóstico para o tipo de leucemia é feito associando o quadro clínico com os resultados dos exames morfológicos e citoquímicos. Os principais exames são: morfologia celular, citogenética, citometria de fluxo e biologia molecular. Cada exame enriquece o diagnóstico, a exemplo da citometria de fluxo, que diferencia os tipos de leucemia com base nas características imunofenotípicas, e da citogenética, que identifica as alterações cromossômicas presentes, as quais possuem papel importante para o prognóstico devido sua correlação com a agressividade da doença (SANCHEZ, 2020). Os resultados necessários para a classificação de uma leucemia como linfóide aguda são: contagem de blastos no mielograma igual ou maior que 20%, definindo como aguda, e identificação da linhagem linfóide, por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo (figura 5) (MOREIRA; BATISTA; SILVA, 2018).

Figura 5 - Representação esquemática do citômetro de fluxo.

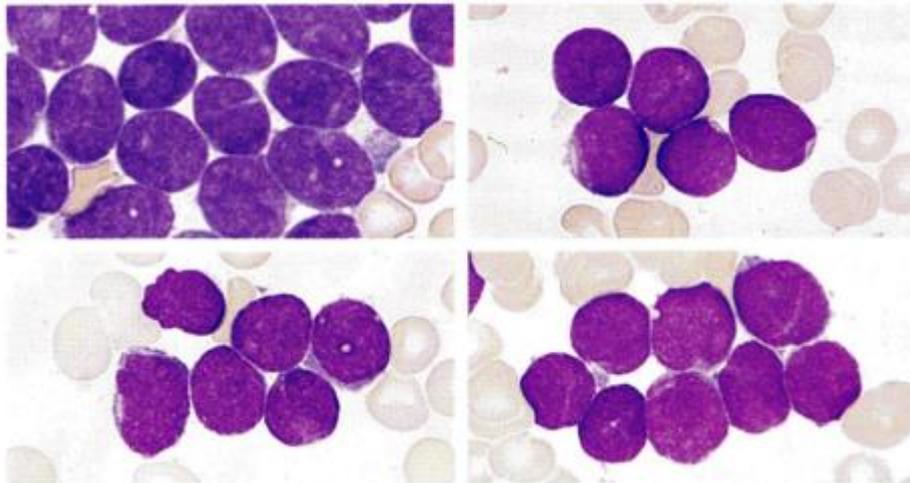


FL1/FL2: Parâmetros de fluorescência, FSC: *forward scatter*, parâmetro que avalia o tamanho celular, SSC: *side scatter*: parâmetro que avalia a complexidade interna das células Fonte: diagnosticosdobrasil.com.br, acesso em 26/11/2022; SILVA, 2010.

### 1.4 Leucemia Linfoide Aguda

A Leucemia linfoide aguda (LLA) é uma patologia maligna dos linfoblastos B ou T caracterizada pela expansão clonal de células precursoras linfoides (figura 6) (PUCKETT; CHAN, 2021). Essas células leucêmicas, progressivamente, substituem e competem com os elementos normais da medula óssea e, por meio do sangue periférico, chegam a diversos órgãos e tecidos, causando sinais e sintomas clínicos, como infecções frequentes, febre, dor óssea, linfadenopatia, palidez, sangramento/hematomas com facilidade, falta de ar, cefaleia, hepatoesplenomegalia, fraqueza e fadiga constantes (GÓMEZ-MERCADO; SEGURA-CARDONA; PÁJARO-CANTILLO; MESA-LARGO, 2020).

Figura 6 – Células de paciente com LLA.



Fonte: FADEL, 2010.

A LLA apresenta um modelo bimodal de distribuição, com o primeiro pico na infância, tendo o risco maior em crianças menores de 5 anos, que diminui até aproximadamente 20 anos retornando a aumentar lentamente no segundo pico, que ocorre após os 50 anos. A maioria dos casos da doença ocorre em crianças - cerca de 6 em cada 10 casos - mas a maioria das mortes - cerca de 4 em 5 - ocorre em adultos. O risco de desenvolver a neoplasia é maior em brancos do que em afro-americanos, além dos homens serem ligeiramente mais propensos que as mulheres (ZUCHERMAN; ROWE, 2014;). Para 2022, as estimativas da *American Cancer Society* (2022) para LLA nos Estados Unidos foram de aproximadamente de 6.660 novos caso e 1.560 mortes em ambos os sexos.

Os fatores etiológicos da LLA não são bem definidos, além de apresentarem um elevado nível de complexidade. Contudo, estudos identificaram uma predisposição relacionada às síndromes genéticas como síndrome de Down, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, ataxia

telangiectasia e síndrome de colapso de Nijmegen, além de outros fatores predisponentes, como exposição à radiação ionizante, infecções virais, bacterianas e fúngicas (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017), tabagismo materno (CHUNXIA *et al.*, 2019) e exposições químicas (ORSI *et al.*, 2018).

A classificação de tumores linfoides da Organização Mundial da Saúde (OMS) é referência global para o diagnóstico desde sua 3ª edição em 2001, baseada na classificação *R.E.A.L (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms)* desenvolvida pelo *International Lymphoma Study Group (ILSG)* no ano de 1994. As definições estabelecidas nas sucessivas classificações da OMS foram adotadas para uso por patologistas, clínicos, cientistas de pesquisa básica e translacional, além de terem sido incorporadas aos códigos da Classificação Internacional de Doenças (CID). A classificação mais atual é a 5ª edição, publicada em 2022, conforme o quadro 1 (ALAGGIO *et al.*, 2022)

Quadro 1 – Classificação da Organização Mundial da Saúde para a Leucemias Linfoblásticas.

#### **Leucemia aguda de linhagem ambígua**

Leucemia aguda indiferenciada

Leucemia aguda de fenótipo misto (MPAL) com t (9;22) (q34.1; q11.2); *BCR-ABL1*

Leucemia aguda de fenótipo misto com t(v;11q23.3); rearranjo *KMT2A*

Leucemia aguda de fenótipo misto, B/mieloide, *NOS*

Leucemia aguda de fenótipo misto, T/mieloide, *NOS*

#### **Leucemia/Linfoma linfoblástico B**

Leucemia/linfoma linfoblástico B, *NOS*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com alta hiperdiploidia

Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia

Leucemia/linfoma linfoblástico B com *iAMP21*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com *BCR::* características semelhantes a *ABL1*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com rearranjo *KMT2A*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com *ETV6::* fusão *RUNX1*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com *ETV6*:: Características do tipo RUNX1

Leucemia/linfoma linfoblástico B com fusão de *TCF3*:: *PBX1*

**Leucemia/Linfoma linfoblástico T**

Leucemia/linfoma linfoblástico T, *NOS*

Leucemia/linfoma linfoblástico precoce T-precursor

Fonte: *NOS* = não especificado. Adaptado de ALAGGIO *et al.*, 2022.

### 1.5 Tratamento de LLA

Para o tratamento de LLA, é fundamental a escolha correta do protocolo terapêutico a ser utilizado, aumentando assim as chances de cura do paciente. Os principais protocolos terapêuticos se baseiam em três partes (figura 7), na seguinte ordem: Indução de remissão - que consiste em restaurar a produção normal das células sanguíneas – intensificação (ou consolidação) – período de tratamento intenso, destinado a prevenir células resistente aos fármacos – e manutenção – fase com objetivo de evitar o retorno da doença, através do uso em baixa concentração de drogas com função de aumentar do tempo de indução - (CAVALCANTE; ROSA; TORRES, 2017). Além desses protocolos, o transplante alogênico de CTHs vem sendo utilizado em casos de pacientes de alto risco e há também o surgimento de novas estratégias terapêuticas, com agentes moleculares específicos e imunoterapia (INABA; MULLIGHAN, 2020).

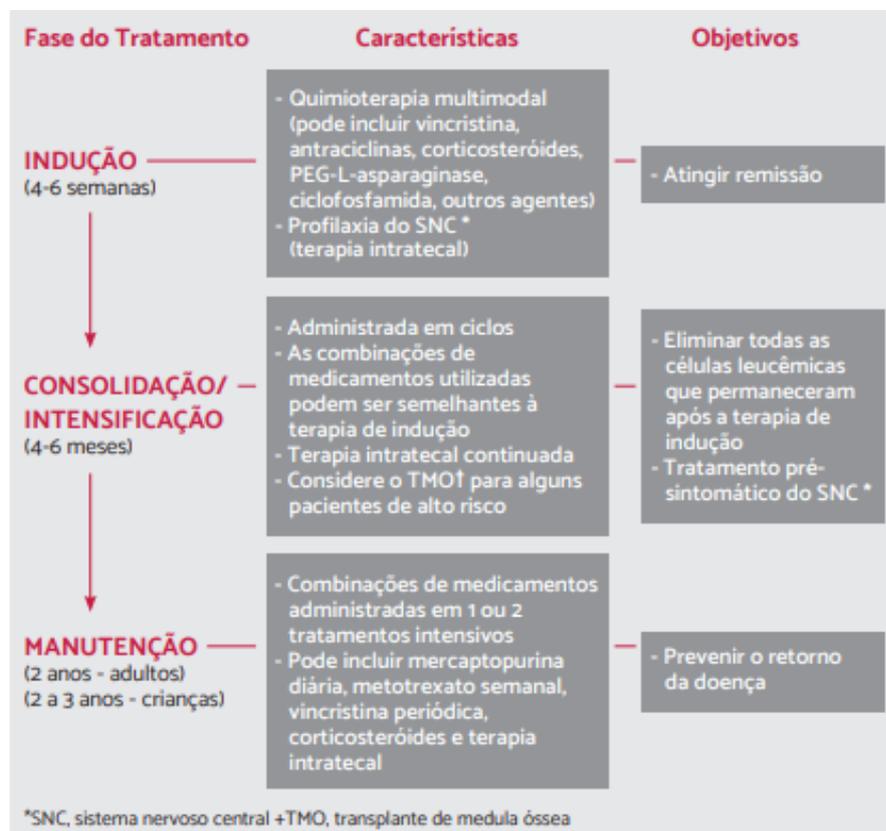
A terapia de indução de remissão consiste em três drogas - um glicocorticoide (prednisona ou dexametasona), vincristina e asparaginase (ASNase) - ou quatro - com adição da antraciclina - administradas durante 4-6 semanas que induzem a remissão completa em aproximadamente 98% dos casos de pacientes pediátricos. A dose, esquema e tipo de glicocorticoide são determinados com base na idade do paciente, risco de recaída e fase do tratamento. O risco de infecção bacteriana durante a neutropenia pode ser reduzido com antibióticos profiláticos, como levofloxacina (INABA; MULLIGHAN, 2020).

O aprimorando do suporte a terapia diminuiu a taxa de mortalidade na indução para 2–3%, mas algumas crianças ainda apresentam eventos adversos graves, incluindo infecção durante o primeiro ciclo de tratamento. Após a terapia de indução, a terapia de consolidação subsequente começa a erradicar as células leucêmicas residuais (KATO; MANABE, 2018).

A segunda etapa do regime de tratamento, a consolidação, consiste em vários ciclos curtos e sequenciais de quimioterapia a cada 2 semanas, geralmente com citarabina, metotrexato em altas doses, vincristina, ASNase, mercaptopurina e glicocorticoides, durante o período de 12 semanas. Essa etapa é seguida por uma fase de intensificação tardia (terapia de reindução) que inclui uma combinação semelhante de drogas usadas durante a terapia de indução (MALARD; MOHTY, 2020).

A terapia de manutenção é administrada após a terapia de consolidação, geralmente dura de 1 a 3 anos e consiste em baixas concentrações de mercaptopurina diária, metotrexato semanal com ou sem vincristina e pulsos de glicocorticoides a cada 1-3 meses. Essas drogas agem no aumento do tempo da indução e tem como objeto prevenir o retorno da doença. Durante o período de tratamento, pode ocorrer o surgimento de efeitos adversos, dentre eles vômitos, náuseas, diarreia, mucosite gastrointestinal, eritema, erupções, maculo papilar, dermatite entre outras patologias (CAVALCANTE; ROSA; TORRES, 2017; KATO; MANABE, 2018; MALARD; MOHTY, 2020).

Figura 7 – Visão Geral do tratamento de LLA.



## 1.6 Tratamento com Asparaginase

Um dos diversos medicamentos utilizados no tratamento para LLA é a enzima bacteriana ASNase, que tem demonstrado uma alta eficiência, durante décadas, na indução de remissão em diversos protocolos (COOK; LITZOW, 2020), podendo ser encontrada em duas formas nativas provenientes ou da *Escherichia coli* ou da *Erwinia chrysanthemia*. A ASNase de *E. coli* é a mais comumente utilizada, enquanto a de *Erwinia* tem seu uso destinado aos pacientes que apresentaram reações de hipersensibilidade à forma originada de *E. coli*, visto que são enzimas desenvolvidas a partir de bactérias, é comum este tipo de reações imunogênicas (CECCONELLO *et al.*, 2020).

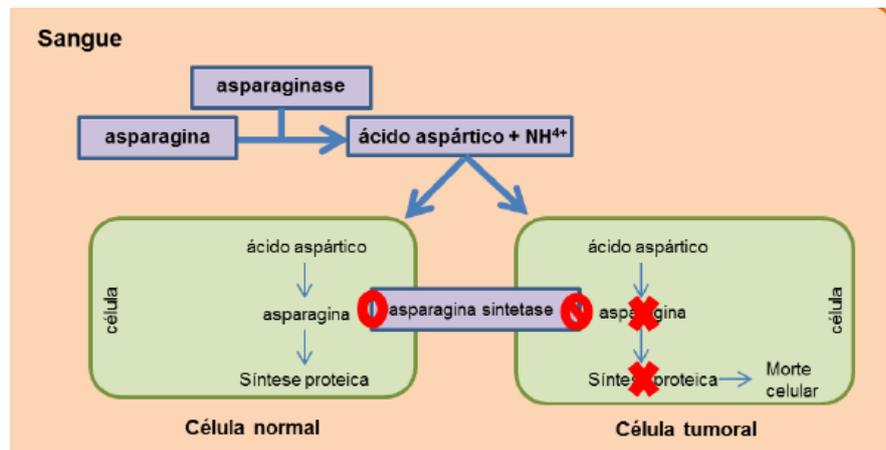
O uso da ASNase resultou em um alto número de casos com o desenvolvimento da hipersensibilidade seguida da produção de anticorpos anti-ASNase e redução da atividade enzimática do fármaco (BATTISTEL *et al.*, 2021). Com objetivo de reduzir o potencial imunogênico e, conseqüentemente, as reações já citadas, foi desenvolvida uma terceira formulação, resultado da conjugação da ASNase de *E. coli* com o polietilenoglicol, chamada de PEG ASNase. Essa nova formulação é administrada pelas vias intramuscular e intravenosa, além disso apresentou menores taxas de formação de anticorpos, meia vida mais longa, depleção mais rápida da asparagina (Asn) e reduziu o número de casos de alergia (PETERSEN *et al.*, 2014).

A ação anti-leucêmica da ASNase advém da redução da Asn circulante, pois a enzima atua como um catalisador da hidrólise de Asn, degradando-a em aspartato e amônio. Devido as células leucêmicas não possuírem ou apresentarem em baixo nível a enzima asparaginasintetase (ASNS) (responsável pela produção de asparagina intracelular), há uma grande dependência da Asn circulante. Com a ausência de Asn, ocorre a inibição da síntese de DNA, RNA, proteínas constitutivas, regulatórias e anti-apoptóticas, levando à morte celular, representada na figura 8. Dessa forma, ocorre uma seleção específica para as células leucêmicas, visto que as células normais da linhagem linfóide não são afetadas, pois apresentam a ASNS expressa em níveis normais (MENEGUETTI, 2017; HEO; SYED; KEAM, 2019).

Devido às grandes variações interpacientes em relação ao desenvolvimento de hipersensibilidade, dos níveis mínimos de atividade da enzima no soro e das diferentes propriedades farmacocinéticas nas formulações utilizadas, é necessário que haja, para ASNase, o monitoramento de drogas terapêuticas (TDM) (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). Como forma de avaliar a terapia recebida pelos pacientes, utiliza-se o monitoramento em tempo real

da atividade da ASNase, devido às limitações para aferir as concentrações de Asn. Com base nessa técnica, é possível coletar dados importantes para o gerenciamento do tratamento, além de identificar casos de inativação imunológica (hipersensibilidade subclínica) (SALZER *et al.*, 2018).

Figura 8 - Mecanismo de ação da asparaginase em células normais e tumorais.



Fonte: CECCONELLO *et al.*, 2020.

Além das reações de hipersensibilidade, devido a ASNase apresentar uma toxicidade sistêmica, a enzima também está relacionada à pancreatite, trombose, hiperglicemia, disfunção neurológica, nefropatia e hepatotoxicidade. Ademais, tanto as formulações nativas de ASNase quanto a PEG ASNase demonstraram ser os agentes antineoplásicos com maior ocorrência de lesão hepática (KAMAL *et al.*, 2019).

### 1.7 Pancreatite Associada à Asparaginase

Dentre as reações citadas, a pancreatite associada à ASNase (PAA) é caracterizada por uma inflamação súbita do parênquima pancreático associada à terapia com ASNase que geralmente se desenvolve entre 3 e 10 dias após a última dose utilizada, sendo um dos efeitos adversos mais graves e frequentemente motivo para interrupção do tratamento. Seu diagnóstico inicial pode ser feito com base nos critérios de Atlanta, no qual o paciente deve apresentar duas das três condições: 1- dor abdominal consistente com pancreatite aguda; 2- níveis séricos de lipase ou amilase pelo menos três vezes acima do limite superior do normal, o uso de ambos os marcadores é importante devido a existência de casos em que um marcador está, porém o outro elevado está normal; e 3- achados característicos de pancreatite aguda em exames de diagnóstico por imagem. A PAA é caracterizada por edema moderado e generalizado do pâncreas, sem insuficiência pancreática, sendo, na maioria dos casos, reversível. Porém, algumas das possíveis complicações graves são: pseudocistos, necessidade de ventilação

assistida, diabetes mellitus dependente de insulina, pancreatite crônica, dor abdominal persistente e morte secundária associada à PAA (GIBSON *et al*, 2021).

Sua incidência varia de 2% a 18% e pacientes com idade entre 10 e 18 anos demonstraram 2,4 vezes mais risco de desenvolver PAA em comparação com pacientes mais jovens, além da estratégia de terapia também influenciar, tendo as terapias de alto risco com PEG ASNase adicional um risco três vezes maior para o surgimento do efeito adverso do que terapias de risco padrão (LIU *et al*, 2016; DENTON *et al*, 2017; LEBOVIC *et al*, 2017). Entre outros fatores de risco estão obesidade e ascendência nativa americana (GIBSON *et al*, 2021). Segundo o estudo de LIU *et al* (2016), a taxa de PAA foi seis vezes maior em pacientes pediátricos que receberam cinco ou mais doses de ASNase superiores a 3.750 UI/m<sup>2</sup> do que em pacientes que receberam doses inferiores a 3.750 UI/m<sup>2</sup> ou menos de cinco doses, demonstrando que a dose/intensidade do tratamento também é um fator de risco.

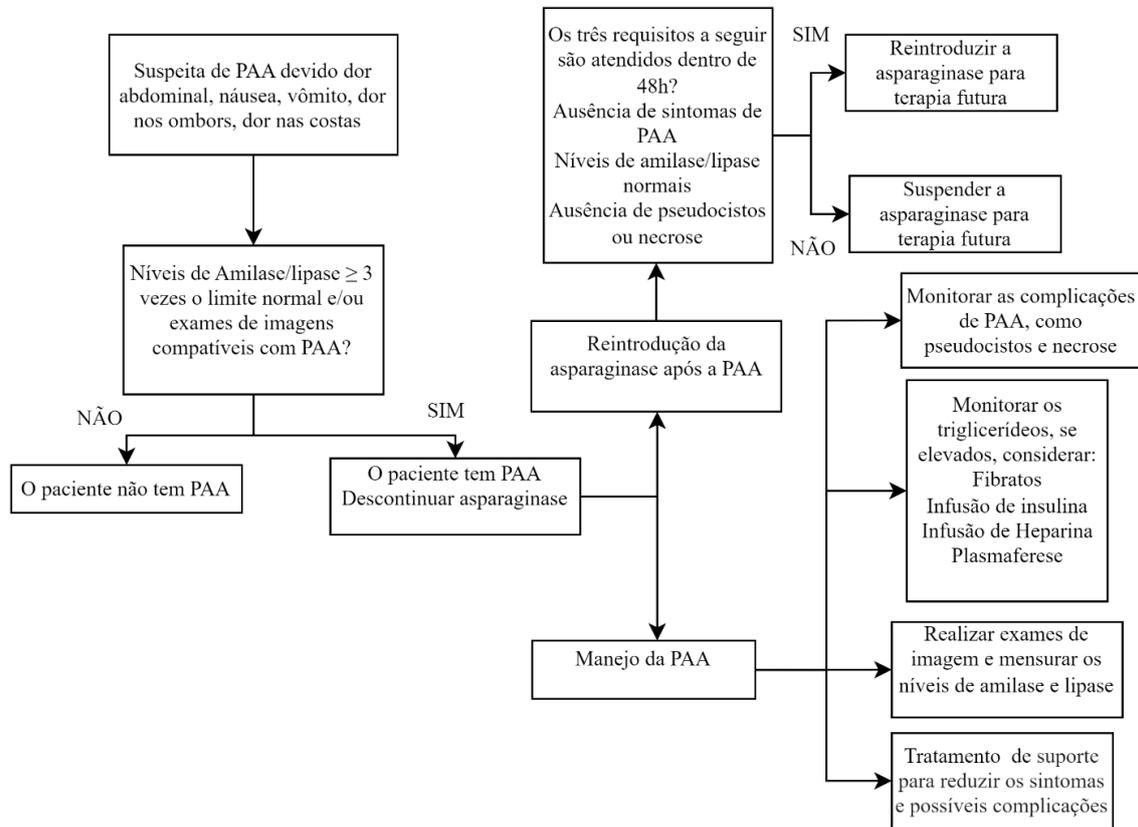
Os sinais e sintomas da PAA são náuseas, vômitos e dor abdominal súbita, comumente localizada na região epigástrica, dor irradiada para as costas ou ombros, febre baixa e derrame pleural (Figura 9), tendo como tratamento o suporte para reduzir os sintomas e possíveis complicações. A pancreatite aguda em si apresenta como complicações a curto prazo necrose pancreática (passível de infecção) e formação de pseudocistos (suco pancreático envolvido por uma parede não epitelizada) e algumas complicações graves como síndrome da resposta inflamatória sistêmica, falência múltipla de órgãos (pulmões e rins os órgãos mais comumente afetados), pneumonia tóxica, síndrome do desconforto respiratório agudo e insuficiência renal (RAJA; SCHMIEGELOW; FRANDBSEN, 2012).

O uso de antibióticos na pancreatite é recomendado quando há a confirmação de necrose infectada, em caso de persistência de dor intensa, é recomendada a remoção cirúrgica das áreas necrosadas, enquanto os casos de pseudocistos devem ser tratados de forma padrão, podendo ser feito também a drenagem percutânea guiada por ultrassom. Na ocorrência de pseudocistos ou de necrose, com ou sem infecção, deve ser feita a suspensão permanente da ASNase (ZAVYALOV *et al*, 2010; BAI *et al*, 2011; JAZRAWI; BARTH, 2011)

Os fatores ligados à enzima, como formulação e método de administração não parecem influenciar no risco de desenvolvimento de pancreatite. A patologia é considerada um reflexo sistêmico da depleção da Asn, causando redução da síntese proteica, afetando órgãos como fígado e pâncreas. Há indícios de interferência de predisposições genéticas, com base que a

reação ocorre após poucas doses administradas e com alto índice de reincidência na reexposição (RAJA; SCHMIEGELow; FRANDSEN, 2012).

Figura 9 - Diagnóstico e tratamento de PAA.



Fonte: Adaptado de RAJA; SCHMIEGELow; FRANDSEN, 2012.

## 1.8 PAA Associada a Fatores Genéticos

Devido a correlação com fatores genéticos de seus efeitos adversos, a farmacogenética da ASNase tem sido estudada com objetivo de aprimorar o tratamento, considerando a variabilidade da base genética de cada paciente (ABAJI; MAJA, 2019). Sendo assim, com base em seus efeitos relacionados à pancreatite e suas frequências na população, as variantes dos genes *CPA2*, *MYBBP1A*, *RGS6* e *ULK2* foram selecionadas com alvos para este estudo.

### 1.8.1 Gene *CPA2*

O gene *CPA2*, localizado no braço longo do cromossomo 7, banda 32, sub-banda 2, codifica uma das três procarboxipeptidases pancreáticas, a procarboxipeptidase A2, que sofre ativação proteolítica no duodeno pela ação da quimotripsina C. Ao ser ativada atua sobre resíduos de aminoácidos aromáticos expostos pela ação de quimiotripsinas e elastases,

hidrolisando ligações peptídicas COOH-terminais em proteínas e peptídeos (SZABÓ *et al*, 2016; NAKANO *et al*, 2015).

Uma das variantes do gene *CPA2* é o rs199695765, que apresenta a frequência mundial de 0,01% e consiste na troca de uma base citosina por timina, o que leva a formação de códon de parada, interrompendo tradução precocemente no éxon 2, códon 51 de uma proteína com 419 aminoácidos, levando à sua não funcionalidade (NCBI, 2022). Conforme o estudo de Liu *et al* (2016), dentre diversas variantes estudadas, esta é elencada como alto risco para o desenvolvimento da PAA. Também foi descrito que a via pela qual esta e outras variantes de *CPA2* elevam o risco do desenvolvimento de PAA ainda não é clara, porém os resultados do estudo sugerem que seu mecanismo possivelmente difere da patogênese de outras formas de pancreatite e também de outras formas de pancreatite associadas a drogas antileucêmicas. Ademais, vale ressaltar que os pacientes portadores desta variante desenvolveram PAA após a primeira dose de ASNase, sugerindo que o medicamento não seria tolerado o tempo necessário para que fosse eficaz, sendo recomendada nestes casos a utilização de uma abordagem com uma dose menor (LIU *et al*;2016).

A partir da análise das consequências da variante rs199695765 foi possível elencar a variante rs3807342 como alvo interessante para estudo, apesar de não haver nenhum relato na literatura. Como a variante rs199695765 tem como consequência a não funcionalidade da proteína sintetizada, porém sendo rara devido sua baixa frequência mundial, buscou-se para o estudo uma outra variante com frequência maior e com potencial para um efeito semelhante ao causado pela rs199695765. A expressão de *CPA2* foi utilizada como base para a escolha de rs3807342, uma variante intrônica causada pela troca de uma base citosina por uma timina, que apresentava, conforme o banco de dados *GTEEx Portal* (2022), uma redução na expressão do gene e uma frequência de aproximadamente 20%, sendo bem maior quando comparado aos 0,01% de rs199695765 (NCBI, 2022). Dessa forma, ao analisar ambas as variantes, seria possível pressupor se a pancreatite é causada devido à ausência da proteína de *CPA2* ou se a redução na sua expressão e consequente menor disponibilidade seria fator suficiente para causar o efeito adverso.

### 1.8.2 Gene *MYBBP1A*

O gene *MYBBP1A*, localizado no braço curto do cromossomo 17, banda 13, sub-banda 2, codifica a proteína 1A de ligação à proteína proto-oncogene c-MYB e possui função

reguladora transcricional nucleolar, sendo também importante em diversos processos celulares como a resposta ao estresse nuclear, síntese de DNA ribossomal, controle do ciclo celular, desenvolvimento embrionário inicial, regulação da inflamação, supressão tumoral via modulação da atividade de p53 e senescência celular (GEORGE *et al*, 2015; FELIPE-ABRIO, VERDUGO-SIVIANES, CARNERO, 2020).

Este gene apresenta a variante rs3809849 que possui a frequência mundial de 18,2% e consiste na troca de uma base de guanina por uma de citosina, alterando o aminoácido codificado pelo códon (NCBI, 2022). Tal variante apresenta associação para o desenvolvimento da PAA, possivelmente devido à função de *MYBBP1A* de co-repressor do fator nuclear kappaB (NF-kB), que pode não ser exercida como consequência da alteração. Dessa forma, não ocorreria a repressão de NF-kB, levando a PAA, visto que NF-kB apresenta um papel fundamental na pancreatite aguda. Ademais, a variante *MYBBP1A* rs3809849 também está associada à trombose durante o tratamento com ASNase (ABAJI *et al*, 2017).

### 1.8.3 Gene *RGS6*

O gene *RGS6*, localizado no braço longo do cromossomo 14, banda 24, sub-banda 2, codifica um membro da família de proteínas RGS (regulador da sinalização da proteína G) que tem como característica a presença de um domínio RGS, atuando como regulador da duração e magnitude da sinalização iniciada por GPCRs - receptores acoplados à proteína G - e modulador de atividades neuronais, cardiovasculares e linfocíticas. Além disso, a proteína *RGS6* também faz parte da subfamília R7 (*RGS6*, *RGS7*, *RGS9*, *RGS11*) de proteínas RGS, caracterizada pela presença de domínios DEP (*disheveled/Egl-10/pleckstrin*) e GGL (semelhante à proteína G gama), que possibilita a interação com proteínas de membrana para controlar o direcionamento celular e a associação com G beta 5. Ademais, o gene *RGS6* já foi encontrado desregulado em alguns tipos de câncer, como carcinoma de ovário, mama e pâncreas (LUO *et al*, 2015; AHLERS, CHAKRAVARTI, FISHER, 2016).

Uma variante de *RGS6* foi associada por WOLTHERS *et al* (2017) com a PAA, a rs17179470 com frequência mundial de 6,6%, que altera uma base de guanina para citosina dentro de uma região intrônica. A hipótese de relação de PAA com esta alteração seria que a presença da proteína *RGS6* em células acinares pancreáticas estaria associada com um melhor quadro de pancreatite. Contudo, o papel de *RGS6* com a fisiopatologia da pancreatite não está totalmente descrito. Existe a possibilidade que esta variante afete o gene de forma negativa,

levando a um pior quadro da inflamação, visto que também já foi descrito por JIANG *et al* (2015) que *RSG6* é encontrado em expressão reduzida, tanto a nível de mRNA quanto de sua proteína, em casos de pacientes com câncer de pâncreas, predizendo um prognóstico ruim (WOLTHERS *et al*, 2017; JIANG *et al*, 2014).

#### 1.8.4 Gene *ULK2*

O gene *ULK2*, localizado no braço curto do cromossomo 17, banda 11, sub-banda 2, codifica uma proteína serina/treonina quinase *ULK2*, importante para a transformação de astrócitos e crescimento de tumores. Além disso, a proteína está relacionada com a rede do gene transcricional *p53* e desempenha papel regulador na autofagia em resposta a fome, devido ao seu envolvimento também na iniciação regulada pela via metabólica mTOR, regulando a formação de autofagóforos, os precursores dos autofagossomos (CHAIKUAD *et al*, 2019; CLOTAIRE *et al*, 2016.).

Este gene apresenta diversas variantes com relevância dentro dos casos de PAA, dentre elas a rs281366, uma troca de uma base de citosina por timina que causa uma variante não codificante de um éxon transcrito, com frequência mundial de 3,7% relatado por WOLTHERS *et al* (2017). A associação de *ULK2* com PAA é especulada devido à sua função na autofagia em resposta à fome, visto que esse processo já foi descrito em relação a inflamações e em específico à pancreatite. Durante o tratamento com ASNase, especula-se que a depleção de asparagina induz um estado semelhante à inanição, onde ocorre regulação positiva da autofagia. Sendo assim, há também a possibilidade de ocorrer uma incidência maior de pancreatite em pacientes com alterações na função autofágica (WOLTHERS *et al* 2017).

Sendo assim, com base na relevância e eficácia do tratamento com a ASNase para os pacientes com LLA, este trabalho visa investigar as variantes dos genes *CPA2*, *MYBBP1A*, *RGS6* e *ULK2* associados à ocorrência de PAA, descrevendo seus possíveis efeitos isolados e em conjunto, além de descrever também suas respectivas frequências alélicas e genotípicas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando a alta eficácia do tratamento com ASNase descrito na literatura, aprofundar o conhecimento sobre essa medicação se faz fundamental. Outro fator de relevância é o alto número de relatos de efeitos tóxicos, tendo sido desenvolvida a formulação PEG ASNase, com objetivo de reduzir essas reações. Sendo assim, é necessário avaliar os efeitos negativos dessa nova formulação nos pacientes que receberem a terapia, visto que a população estudada, referente à região Norte do país, apresenta uma grande variabilidade e miscigenação genética, informação relevante a ser considerada na abordagem farmacogenética, devido haver indícios de interferência de variantes gênicas no desenvolvimento de PAA durante o tratamento.

A descrição da influência das variantes estudadas na clínica do paciente é um valioso conhecimento para a utilização do tratamento com PEG ASNase, visto que, através da genotipagem, haveria a possibilidade de avaliar se o tratamento seria efetivo e prevenir efeitos tóxicos no paciente. Dessa forma, caso fosse necessário, se iniciaria um tratamento com outra medicação, fornecendo agilidade na quimioterapia, além de segurança, pois evitaria o desenvolvimento de efeitos prejudiciais ao paciente, que levariam à interrupção do tratamento com PEG ASNase.

Devido a gravidade do efeito adverso, sendo constantemente uma das principais razões para interrupção de tratamento, avançar no entendimento do mecanismo responsável e quais fatores possuem interferência na ocorrência de PAA se torna fundamental para garantir a eficácia e segurança da terapia. Sendo assim, este trabalho visa corroborar para melhoria na assistência de pacientes com LLA, fornecendo informações sobre características genéticas que, caso estejam presentes nos pacientes, apresentam potencial para prejudicar o tratamento com essa medicação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Investigar e correlacionar parâmetros genéticos com os dados clínico-fenotípicos de pacientes com LLA sob tratamento com PEG ASNase.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a genotipagem das variantes rs199695765 e rs3807342 do gene *CPA2*, rs3809849 do gene *MYBBP1A*, rs17179470 do gene *RGS6* e do gene rs281366 *ULK2* em amostras de pacientes com LLA;
- Investigar o impacto das variantes investigadas como preditoras de risco a pancreatite associada a asparaginase (PAA);
- Avaliar o efeito de conjunto de variantes em potencial no risco de PAA;
- Avaliar as frequências alélicas das variantes na população estudada em relação ao risco de PAA;
- Avaliar as frequências genotípicas das variantes na população estudada em relação ao risco de PAA.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo e Amostragem**

Trata-se de um estudo de caráter observacional. A amostragem foi não-probabilística por conveniência. Foram analisados um total de 35 pacientes, atendidos pelos serviços oncológicos do Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo (HOIOL), no estado do Pará, e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no estado do Rio Grande do Sul, no período de 10/2020 a 09/2022. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram coletados 5mL de sangue periférico em tubos contendo o anticoagulante EDTA, ou aspirado de medula óssea quando necessário.

### **4.2 Critérios de Inclusão**

Foram incluídos indivíduos com faixa etária de 0 a 19 anos de idade, atendidos pelos serviços oncológicos do Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo e pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre, diagnosticados com LLA por médico especialista e que fizeram uso da medicação PEG ASNase.

### **4.3 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos: I) indivíduos acometidos por outras neoplasias; II) abandono do tratamento ou transferência para outro serviço de oncologia, III) indivíduos que por algum motivo não aceitaram preencher o TCLE, em concordância com a Resolução 466/12, conforme documento em anexo e IV) indivíduos que não utilizaram a medicação PEG ASNase.

### **4.4 Aspectos Éticos**

Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, respeitando as diretrizes para pesquisa com seres humanos, Número dos Pareceres: CAAE:30307820.7.0000.5634 e CAAE: 32764720.9.1001.5327, respectivamente.

### **4.5 Extração de Material Genético**

O primeiro procedimento empregado nas amostras foi a extração de DNA pelo Kit *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* – convenientemente usado para o isolamento de DNA genômico de sangue, cauda de rato, tecido animal e swab bucal –, aplicando o protocolo estabelecido no manual do fabricante.

#### 4.6 Integridade das Amostras

A expressão gênica pode ser alterada por múltiplos fatores, entre eles, a própria qualidade do material genético obtido por extração, em vista disso, a integridade da amostra usada deve ser uma prioridade. Dessa maneira, antes do início da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), as amostras extraídas do material de cada paciente foram aplicadas em gel de agarose a uma concentração 1%, diluído em tampão TEB 1x e misturado com intercalante de SYBR<sup>®</sup> Safe (Thermo Fisher Inc.), nas seguintes condições de corrida, 100V e 60mA. Após a corrida, o gel foi colocado em transiluminador *Safe Imager 2.0 Blue Light Transiluminator* (Invitrogen, EUA), para visualização das bandas de DNA.

#### 4.7 Quantificação dos Material Genético Extraído

Após a extração, foi realizada quantificação de DNA, o qual é essencial para verificar se há uma concentração (10 ng/uL) e pureza adequada do material a ser usado nas análises do projeto. Essa quantificação foi realizada utilizando a metodologia de espectrofotometria no equipamento *NanoDrop<sup>™</sup>1000 Spectrophotometer V3.8*, que é capaz de determinar também a pureza do DNA extraído, por meio de protocolo padrão instituído para esse tipo de amostra e procedimento.

#### 4.8 PCR Qualitativo em Tempo Real (qPCR)

A genotipagem foi realizada usando o *TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay* da marca Thermo Fisher Scientific Inc. para rs199695765 e rs3807342 do gene *CPA2*, rs3809849 do gene *MYBBP1A*, rs17179470 do gene *RGS6* e rs281366 do gene *ULK2*, utilizando o sistema *TaqMan<sup>®</sup> Genotyping Master Mix*, também da marca Thermo Fisher Scientific Inc.. Todas as reações de PCR foram feitas no equipamento o *StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

#### 4.9 Análise Estatística

Os dados clínicos e os resultados dos testes foram tabelados no programa Excel (*Microsoft*, Redmond, Washington, EUA) para posterior análise. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando recursos dos programas *IBM SPSS Statistics 29.0* (IBM Corp., 2022) - para os cálculos de Exato de Fisher e Qui-quadrado - e *BIOESTAT 5.0* (AYRES *et al.*, 2007) - para os cálculos de Odds Ratio- com valor de  $p \leq 0,05$  em todos os testes. Os testes de Exato de Fisher e Qui-quadrado foram utilizados para verificar a correlação da presença das variantes, tanto isoladas quanto associadas entre si, com o risco/fator protetivo de ocorrência de PAA,

enquanto que o teste de Odds Ratio foi utilizado para verificar o respectivo valor (Odds Ratio) das variantes associadas com resultado significativo.

## 5 Resultados

A população participante do estudo foi composta por 35 pacientes com o diagnóstico de LLA e que realizaram o tratamento com a medicação PEG ASNase. Dentre esses pacientes, 6 apresentaram PAA (tabela 1). Em relação as variantes, nenhum paciente apresentou a variante rs199695765 do gene *CPA2*, porém, nos demais houve 12 pacientes heterozigotos e 3 pacientes homozigotos para a variante rs3807342 do gene *CPA2*, 10 pacientes heterozigotos e 2 pacientes homozigotos para a variante rs3809849 do gene *MYBBP1A*, 3 pacientes heterozigotos para a variante rs17179470 do gene *RGS6* e 4 pacientes heterozigotos para a variante rs281366 do gene *ULK2*.

Tabela 1: Ocorrência de PAA e das variantes dos genes *CPA2*, *MYBBP1A*, *RGS6* e *ULK2* em cada paciente.

		<b>CPA2rs19</b>	<b>CPA2rs38</b>	<b>MYBBP1A</b>	<b>RGS6</b>	<b>ULK2</b>
	<b>PANCREATITE</b>	<b>rs199695765</b>	<b>rs3807342</b>	<b>rs3809849</b>	<b>rs17179470</b>	<b>rs281366</b>
1	SIM	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
2	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
3	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
4	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
5	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
6	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Heterozigoto C/T
7	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
8	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
9	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
10	SIM	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
11	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
12	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
13	SIM	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
14	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
15	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
16	SIM	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Heterozigoto G/T	Heterozigoto C/T
17	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
18	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto T/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Heterozigoto C/T
19	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
20	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
21	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
22	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Heterozigoto G/T	Homozigoto C/C
23	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
24	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto T/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
25	SIM	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
26	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
27	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
28	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
29	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
30	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
31	NÃO	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
32	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto T/T	Heterozigoto G/C	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
33	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
34	NÃO	Homozigoto C/C	Homozigoto C/C	Homozigoto G/G	Homozigoto G/G	Homozigoto C/C
35	SIM	Homozigoto C/C	Heterozigoto C/T	Homozigoto G/G	Heterozigoto G/T	Heterozigoto C/T

Fonte: próprio autor.

A partir desta tabela, todos os dados foram convertidos para códigos numéricos e se deu início às análises estatísticas no programa *SPSS*. Na conversão numérica, os genótipos se tornaram: homocigoto selvagem = 0, heterocigoto = 1 e homocigoto para a variante = 2 e, enquanto que a presença de PAA se tornou: não = 1 e sim = 2. Inicialmente foi realizada a sumarização do intervalo de confiança da estimativa com os resultados encontrados. Com base na população do estudo, que apresentou uma estimativa pontual de 17,1% de ocorrência de PAA, a população que segue os mesmos critérios de inclusão e exclusão deste estudo (LLA, realização de tratamento com PEG ASNase, 0-19 anos) apresenta uma estimativa de ocorrência de PAA que varia entre 6,6% e 33,6% para intervalo de confiança de 95% (tabela 2).

Tabela 2: Sumarização do intervalo de confiança por meio do teste Clopper-Pearson.

Tipo de intervalo de confiança	Parâmetro	Estimativa	95% Intervalo de Confiança	
			Inferior	Superior
Taxa de Sucesso Binomial de uma Amostra (Clopper-Pearson)	Probabilidade (PANCREAT=2, 000).	,171	,066	,336

Fonte: próprio autor.

Após a sumarização, as variantes de cada gene foram testadas para verificar a existência de associação entre suas respectivas presenças com a ocorrência de PAA. A variante rs199695765 do gene *CPA2* foi retirado das análises estatísticas de associação devido a sua não ocorrência dentro da população estudada. A decisão pela análise por Teste de Fisher foi devido ao fato de que algumas premissas para uso do Qui-quadrado não terem sido atingidas, tal como mais de 5 eventos por item avaliado.

As duas primeiras variantes testadas foram rs3809849 do gene *MYBBP1A* e rs3807342 do gene *CPA2* para associação de genótipo com a ocorrência de PAA. Houve pacientes heterocigotos e homocigotos para ambas as variantes, porém, no teste de Exato de Fisher ambas apresentaram um *p value* não significativo (tabela 3), sendo em *MYBBP1A* 0,799 e em *CPA2* 0,939.

Posteriormente, foram testadas as variantes rs17179470 do gene *RGS6* e rs281366 do gene *ULK2*, também pelo teste de Exato de Fisher, porém ambas as variantes apresentaram apenas pacientes heterocigotos. Como demonstrado na tabela 4, essas variantes também não

apresentaram associação significativa com PAA, tendo os resultados de  $RGS6 = 0,070$  e  $ULK2 = 0,128$ , sendo ambos acima do valor de significância  $p \leq 0,05$ .

Tabela 3: Testes de Exato de Fisher para correlação dos genótipos das variantes rs3809849 do gene *MYBBPIA* e rs3807342 do gene *CPA2* genes com a ocorrência de PAA.

<i>MYBBPIA</i> rs3809849	Pancreatite		Total	<i>CPA2</i> rs3807342	Pancreatite		Total
	Não	Sim			Não	Sim	
% de homozigotos sem variante	18 78,30%	5 21,70%	23 100,00%	% de homozigotos sem variante	17 85,00%	3 15,00%	20 100,00%
% de heterozigotos	9 90,00%	1 10,00%	10 100,00%	% de heterozigotos	9 75,00%	3 25,00%	12 100,00%
% de homozigotos para a variante	2 100,00%	0 0,00%	2 100,00%	% de homozigotos para a variante	3 100,00%	0 0,00%	3 100,00%
Total	29 82,90%	6 17,10%	35 100,00%	Total	29 82,90%	6 17,10%	35 100,00%

<i>MYBBPIA</i> rs3809849	Valor	Monte Carlo Sig. (para Sim)			<i>CPA2</i> rs3807342	Valor	Monte Carlo Sig. (para Sim)		
		Sig.	Intervalo de conf. de 99%				Sig.	Intervalo de conf. de 99%	
			Limite Inferior	Limite Superior				Limite Inferior	Limite Superior
Teste de Exato de Fisher	0,799	0,754	0,743	0,765	Teste de Exato de Fisher	0,939	0,800	0,790	0,810

Fonte: próprio autor.

Tabela 4: Testes de Exato de Fisher para correlação dos genótipos das variantes rs17179470 do gene *RGS6* e rs281366 do gene *ULK2* genes com a ocorrência de PAA.

<i>RGS6</i> rs17179470	Pancreatite		Total	<i>ULK2</i> rs3807342	Pancreatite		Total
	Não	Sim			Não	Sim	
% de homozigotos sem variante	28 87,5%	4 12,5%	32 100,0%	% de homozigotos sem variante	27 87,1%	4 12,9%	31 100,0%
% de heterozigotos	1 33,3%	2 66,7%	3 100,0%	% de heterozigotos	2 50,0%	2 50,0%	4 100,0%
Total	29 82,9%	6 17,1%	35 100,0%	Total	29 82,9%	6 17,1%	35 100,0%

<i>RGS6</i> rs17179470	<i>p value</i>	<i>ULK2</i> rs281366	<i>p value</i>
Teste de Exato de Fisher	0,070	Teste de Exato de Fisher	0,128

Fonte: próprio autor.

Para as variantes que apresentaram pacientes heterozigotos e homozigotos, rs3809849 do gene *MYBBPIA* e rs3807342 do gene *CPA2*, além do teste por genótipo, foi feito o teste de frequência alélica dominante por meio do Exato de Fisher. Os grupos heterozigoto e homozigoto para a variante foram somados para cada análise, formando a população com pelo menos um alelo alterado, que foi comparada com a população sem nenhum alelo alterado. Dessa forma, foi possível analisar pra cada variantes se a presença de um alelo alterado estaria associada com a ocorrência de PAA. Os resultados também não foram significativos (tabela 5), sendo 0,64 e 1,00 para *MYBBPIA* e *CPA2*, respectivamente, estando acima do valor de significância  $p \leq 0,05$ .

Tabela 5: Testes de Exato de Fisher para correlação da frequência alélica das variantes rs3809849 do gene *MYBBPIA* e rs3807342 do gene *CPA2* com a ocorrência de PAA.

<i>MYBBPIA</i> rs3809849	Pancreatite		Total	<i>CPA2</i> rs3807342	Pancreatite		Total
	Não	Sim			Não	Sim	
Sem variante	18	5	23	Sem variante	17	3	20
	78,3%	21,7%	100,0%		85,0%	15,0%	100,0%
Ao menos um alelo variante	11	1	12	Ao menos um alelo variante	12	3	15
	91,7%	8,3%	100,0%		80,0%	20,0%	100,0%
Total	29	6	35	Total	29	6	35
	82,9%	17,1%	100,0%		82,9%	17,1%	100,0%
<i>MYBBPIA</i> rs3809849			<i>p value</i>	<i>CPA2</i> rs3807342		<i>p value</i>	
Teste de Exato de Fisher			0,640	Teste de Exato de Fisher		1,000	

Fonte: próprio autor.

Após a análise individual de cada variante, a ocorrência de PAA foi avaliada em correlação com a contagem de variantes alteradas de cada paciente. A população estudada foi dividida em quatro grupos: grupo 0,00 = ausência de variantes, grupo 1,00 = presença de uma variante, grupo 2,00 = presença de duas variantes e grupo 3,00 = presença de três variantes. O resultado da análise por Exato de Fisher não foi significativo (tabela 6).

Também foi avaliada a correlação da frequência alélica das variantes com ocorrência de PAA, independentemente do gene. Todos as ocorrências de variantes foram somadas formando o grupo “ao menos um gene com algum alelo alterado” e os pacientes que não apresentam nenhuma variante formaram o grupo “nenhum gene com algum alelo alterado” (tabela 7). O resultado do teste de Exato de Fisher foi de 0,640, não sendo significativo.

Tabela 6: Testes de Exato de Fisher para correlação de contagem de variantes com a ocorrência de PAA.

Contagem de Variantes	Pancreatite		Total
	Não	Sim	
0,00 Ausência de variantes	10 90,9%	1 9,1%	11 100,0%
1,00 Presença de uma variante	12 80,0%	3 20,0%	15 100,0%
2,00 Presença de duas variantes	7 87,5%	1 12,5%	8 100,0%
3,00 Presença de três variantes	0 0,0%	1 100,0%	1 100,0%
Total	28	4	32
	87,5%	12,5%	100,0%

Contagem de Variantes	Valor	Monte Carlo Sig. (para Sim)		
		Sig.	Intervalo de conf. de 99%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Teste de Exato de Fisher	4,116	0,296	0,285	0,308

Fonte: próprio autor.

Tabela 7: Testes de Exato de Fisher para correlação da frequência alélica das variantes com a ocorrência de PAA.

Frequência Alélica	Pancreatite		Total
	Não	Sim	
Sem variante	10 90,9%	1 9,1%	11 100,0%
Ao menos um alelo variante	19 79,2%	5 20,8%	24 100,0%
Total	29	6	35
	82,9%	17,1%	100,0%

Frequência Alélica	<i>p value</i>
Teste de Exato de Fisher	0,640

Fonte: próprio autor.

Por fim, com base nos resultados encontrados, foi feita análise da correlação da ocorrência de PAA com as variantes rs17179470 do gene *RGS6* e rs281366 do gene *ULK2* em conjunto. Os pacientes foram divididos em três grupos: nenhuma variante, uma variante entre os dois genes e uma variante em cada gene. O resultado do teste de Exato de Fisher foi de 0,22 sendo abaixo do valor de significância  $p \leq 0,05$ , tornando este resultado significativo (tabela 8). Complementarmente, foi realizado o Odds Ratio, unindo os dois últimos grupos para casos e utilizando o primeiro grupo isolado para controle (figura 11), tendo o resultado de  $OR = 0,1154$ .

Tabela 8: Testes de Exato de Fisher para correlação das variantes rs17179470 do gene *RGS6* e rs281366 do gene *ULK2* em conjunto com a ocorrência de PAA.

<i>RGS6</i> + <i>ULK2</i>	Pancreatite		Total
	Não	Sim	
Nenhuma variante	26 89,7%	3 10,3%	29 100,0%
Uma variante entre os dois genes	3 75,0%	1 25,0%	4 100,0%
Uma variante em cada gene	0 0,0%	2 100,0%	2 100,0%
Total	29 82,9%	6 17,1%	35 100,0%
	26	3	29

<i>RGS6</i> + <i>ULK2</i>	Sim
Teste de Exato de Fisher	0,022

Fonte: próprio autor.

Figura 10: Teste de "Odds Ratio" no programa Bioestat 5.0

**Teste de "Odds Ratio"**

Imprimir

**Dados**

	Sucessos	Insucessos	p
Amostra 1	3	3	p1 0.5000
Amostra 2 (controle)	26	3	p2 0.8966

Executar Cancelar

**Resultados**

"Odds Ratio" = **0.1154** (p) = **0.0799**

IC 95%: **0.0157** ≤ μ ≤ **0.8503**

ARR: **39.66%**

**NNT - Número Necessário para Tratar e prevenir 1 evento desfavorável no tempo t**: **3**

Fonte: próprio autor.

## 6 Discussão

A ASNase se mostrou um medicamento de alto valor na terapia de LLA infantil, devido sua ação que afeta de forma seletiva as células leucêmicas, porém, os efeitos adversos relacionados a esse quimioterápico reduzem o número de pacientes capazes de utilizar de forma eficaz. Dentro desses efeitos se encontra a PAA, uma complicação grave e que na maioria dos casos leva a interrupção da terapia, atrasando o tratamento da LLA e que também coloca o paciente em uma situação de risco. Devido não existir um protocolo específico para pancreatite aguda, sendo o tratamento apenas de suporte para os sinais e sintomas, compreender a forma que o uso de ASNase causa a PAA e seus fatores de risco, como o perfil genético, são pontos-chave para o desenvolvimento de ferramentas de predição deste efeito e, conseqüentemente, de intervenções para pacientes com possíveis predisposições.

Diante desses fatos, buscamos avaliar a correlação com a PAA e o potencial como possíveis preditores das variantes rs199695765 e rs3807342 do gene *CPA2*, rs3809849 do gene *MYBBP1A*, rs17179470 do gene *RGS6* e do gene rs281366 *ULK2*. Além disso, também se buscou verificar se os dados já descritos, como incidência, frequência e associação com a PAA, se reproduzem na população estudada, considerando a grande miscigenação e variabilidade genética que há no Brasil.

O tamanho amostral e o número de pacientes com PAA foram fatores limitantes deste estudo. Contudo, foi possível realizar diversas análises comparativas com a literatura, iniciando pela incidência de 17,1% de reação dentro da população estudada, que se demonstrou no intervalo dos 2% a 18% já descritos no trabalho de GIBSON *et al* (2021), corroborando com este estudo em relação a taxa de incidência nos pacientes de LLA que realizam a terapia com PEG ASNase.

A variante rs199695765 do gene *CPA2* não foi encontrada dentro da amostra estudada, conseqüentemente, não sendo possível correlacionar sua presença com a PAA. Porém, o fato de estar ausente, em um grupo de somente 35 pacientes, corrobora com o trabalho de LIU *et al* (2016), que encontrou a variante em apenas dois pacientes de uma amostra composta por 5,398 crianças, sendo assim uma variante rara, com frequência mundial, segundo a base de dados NCBI (2022), de 0,01%. Ademais, a associação desta variante com PAA feita por LIU *et al* (2016) não foi replicada no estudo de WOLTHERS *et al* (2017), visto que em seu trabalho somente a variante rs2178158 de *CPA2* apresentou um resultado significativo. A escolha da variante rs199695765 para o estudo, apesar da baixa frequência, foi guiada pela hipótese de sua

frequência ser baixa na população mundial, mas que poderia ser encontrada com mais facilidade se a população de referência fosse de pacientes com PAA, visto o efeito de alto impacto da variação para o surgimento deste quadro.

A outra variante de *CPA2* analisada, rs3807342, apresentou o uma frequência alélica (para C>T) de 42,85% na população estudada, maior do que as frequências mundial e da América Latina de 20% e 17%, respectivamente (NCBI, 2022). Apesar da alta incidência, a associação com a PAA não foi significativa, estando presente em apenas dois dos seis casos do efeito adverso. Apesar de ainda não descrita na literatura, a falta de significância de rs3807342, considerando a interferência da variante rs199695765 que inviabiliza a proteína de *CPA2*, possibilita o levantamento da hipótese de que a redução da expressão deste gene, ocasionada pelo rs3807342, possa não ser fator impactante o suficiente para o desenvolvimento de PAA, enquanto que alterações que afetem a funcionalidade da proteína tenham um maior potencial de risco. Sendo assim, a investigação futura da correlação de variantes de *CPA2* que afetem diretamente a proteína é válida em busca de uma melhor compreensão do mecanismo desta reação.

Os resultados de frequência alélica (para G>C) da variante rs3809849 do gene *MYBBP1A*, assim como os de rs3807342, foram superiores em relação às frequências mundial e América Latina, sendo 34% em comparação a 18,2% e 1,2%. Sua associação com a PAA, tanto por genótipo, quanto por frequência alélica não foi significativa, diferente dos resultados encontrados por ABAJI *et al* (2017). Porém, esses resultados, corroboram com o trabalho de NIELSEN *et al* (2022) que também não teve desempenho semelhante ao descrito para o gene *MYBBP1A*, sendo possível que a não repetição da correlação em ambos os trabalhos possa estar relacionada com a não similaridade da população que compõe a amostra, nos quesitos exposição à asparaginase e critérios de diagnóstico de PAA, além do perfil genético dos pacientes.

Com resultado mais próximo da frequência na população mundial de 6,6% (NCBI, 2022), a variante rs17179470 do gene *RGS6* apresentou a incidência de 8,5% nos pacientes participantes. O estudo de WOLTERS *et al* (2017), em uma amostra de 1504 pacientes, associou a presença desta variante com a PAA, tanto isolada, com uma incidência acumulada de 29,7% nos pacientes portadores, quanto em conjunto com a variante rs281366 do gene *ULK2* elevando a incidência acumulada em pacientes com idade inferior a 10 anos para 85,7%. Nos resultados do presente estudo, a associação isolada da variante de *RGS6* atingiu o valor de  $p=0,070$ , não sendo significativo apesar de bem próximo do valor de  $p\leq 0,05$ , o que demonstra

uma possível tendência em relação ao efeito adverso. Essa tendência é um indicador da importância de *RGS6* em pesquisas futuras, visto que, há uma grande possibilidade de o resultado não significativo encontrado estar diretamente relacionado às limitações de amostragem deste estudo.

A última variante, rs281366 do gene *ULK2*, apresentou um resultado de incidência de 11,4%, aproximadamente o triplo da frequência mundial de 3,7% (NCBI, 2022). Sua correlação com a PAA também não foi significativa, atingindo o valor de  $p=0,128$ , longe da significância, porém mais próximo da mesma que as variantes de *CPA2* e *MYBBP1A*, sendo mais uma variante interessante para estudos futuros, visto que há a possibilidade de as limitações de amostragem também estarem relacionadas com a ausência de significância deste gene. Como já exposto, esta variante foi associada à PAA quando presente em conjunto com rs17179470 do gene *RGS6*, sua incidência isolada acumulada foi de 30,2%, enquanto que o valor do mesmo critério, na ausência de ambas as variantes (*RGS6* e *ULK2*) foi de 4,1% (WOLTHERS *et al*, 2017).

A associação da presença conjunta das variantes rs17179470 do gene *RGS6* e rs281366 do gene *ULK2* com PAA, assim como no trabalho citado anteriormente, também foi encontrada no presente estudo. Houve dois pacientes heterozigotos para as duas variantes, ambos com PAA e nos testes estatísticos, o conjunto atingiu o valor significativo de  $p=0,022$ . O resultado de OR = 0,1154 também indica que há um efeito protetivo para a ausência de ambas as variantes. A reprodutividade desse resultado em um estudo com tamanho amostral reduzido quando comparado a outros trabalhos, além de outras limitações, reforça a consistência e importância desta associação, além de demonstrar, devido as diferentes funções entre os genes, que a suscetibilidade genética à PAA é provavelmente definida por diversas variantes em vias diferentes. Diante desses resultados, o conjunto de rs17179470 e rs281366 tem potencial para desenvolvimento de medidas preditoras para o efeito adverso evitando assim sua ocorrência, visando agilidade e eficácia no tratamento do paciente de LLA.

A avaliação sobre a interferência do número de variantes presentes e da frequência de alelos alterados no desenvolvimento da pancreatite durante o tratamento também não se mostrou significativo, demonstrando que o acúmulo de variantes e o aspecto homozigose/heterozigose não são fatores de risco. Vale ressaltar a variabilidade encontrada entre os perfis genéticos conforme as populações de outros trabalhos, evidenciadas pelas diferenças nas taxas de incidência das variantes. Essa variabilidade se faz presente não só entre

países ou continentes, mas também entre diferentes regiões do próprio país, a exemplo do número de casos de PAA nos pacientes atendidos pelo HOIOL, que em uma amostra de 26 pacientes apresentou 5 casos, quando comparados aos do HCPA, que de aproximadamente 200 pacientes atendidos após o início da pesquisa com a formulação PEG ASNase, apresentou apenas 1 caso.

Devido a associação dos efeitos adversos do tratamento com ASNase com variantes gênicas ser um tema em construção, diversos trabalhos, como o de NIELSEN *et al* (2022), buscam ao mesmo tempo que investigam novos alvos, reproduzir os resultados já descritos, como forma de ratificação. Há também trabalhos de revisão, como de ABAJI, KRAJINOVIC (2019), que sintetizam as variantes relatadas e, com base em estudos que encontraram ou não os mesmos resultados, atualizam as respectivas informações, auxiliando para a conclusão sobre validade de cada variante em relação os efeitos adversos. Os resultados aqui encontrados com a investigação das variantes já relatadas e de um alvo em potencial, rs3807342 do gene *CPA2*, inserem este trabalho na produção atual sobre o tema, fornecendo mais dados para o enriquecimento da literatura e aproximando a validação necessária para produzir um painel genético eficaz, com capacidade de prever a PAA, sendo uma ferramenta futura de grande valor para o tratamento de LLA com ASNase.

O trabalho de NIELSEN *et al* (2022) é o mais atual com foco em desenvolver esse tipo de painel que, tendo utilizado ferramentas de *Machine Learning* para prever os casos de PAA, alcançou um grupo de variantes, com seus respectivos genes, definido como mais preditivo, composto por rs10273639 (*PRSS1-PRSS2*), rs10436957 (*CTRC*), rs13228878 (*PRSS1/PRSS2*), rs1505495 (*GALNTL6*) e rs4655107 (*EPHB2*). Com base na associação encontrada neste trabalho das variantes conjuntas de *RGS6* e *ULK2* e nas aplicações farmacogenômicas, que correlacionam o efeito entre os genes no tratamento, o impacto da presença simultânea de outras variantes, como as que compõem o grupo descrito acima, deve ser estudado e incluso na produção de painéis para predição, pois amplia a acurácia de quanto o risco de PAA será elevado ou reduzido conforme o perfil genético individual do paciente e consequentemente direciona, de forma mais precisa, as decisões tomadas para a terapia frente a casos com este efeito adverso.

Outro ponto importante para a constante busca de reproduzir resultados já descritos é, devido a diversidade genética, a frequência das variantes em cada população, que pode ser diferente das encontradas na literatura, como demonstrado na tabela 9. Essa frequência acaba sendo um fator de grande impacto e possivelmente razão pela qual certos estudos não

conseguem repetir resultados semelhantes de outros trabalhos, destacando a importância da avaliação populacional. O presente trabalho exemplifica bem o uso dessas informações, no qual a variante rs199695765 do gene *CPA2* não foi encontrada e, logo, não houve replicação de sua associação, porém sua frequência na América Latina, segundo a base de dados NCBI (2022) é de 0%, demonstrando que há a possibilidade desta alteração não ter validade como fator de predição/risco no Brasil devido a sua ausência na população. Sendo assim, o desenvolvimento deste tipo de análise é de extrema importância, visto que por consequência, descreve geneticamente a população de cada região, além de atender e fornecer suporte eficaz aos pacientes, por meio da terapia individual. Ademais, a produção deste tipo de trabalho no Brasil tem grande relevância, devido a carência sobre esta abordagem em relação a PAA no tratamento de LLA.

Tabela 9: Frequência de cada variante analisada conforme a população de cada estudo.

Variante	Número de controles	Número de casos com PAA	Frequência da variante em controles	Frequência da variante em casos de PAA	Autor	Frequência da variante na região da população do artigo	Frequência da variante na região da população estudada	Frequência da variante na população estudada
<i>CPA2</i> rs199695765	3469	117	0 % (0)	1,7% (2)	LIU <i>et al</i> , 2016	Mundial: 0,01%	Latino Americanos: 0,0%	0%
<i>MYBBP1A</i> rs3809849	19	247	13,5% (11)	33,2 % (82)	ABAJI <i>et al</i> , 2017	Mundial: 18,2%	Latino Americanos: 1,2%	34%
<i>RGS6</i> rs17179470	517	45	3,86% (20)	20% (9)	WOLTHER S <i>et al</i> , 2017	Europeus: 6,5%	Latino Americanos: 11,3%	8,5%
<i>ULK2</i> rs281366	638	62	2,4% (15)	10,5% (6)	WOLTHER S <i>et al</i> , 2017	Europeus: 2,5%	Latino Americanos: 2,4%	11,4%

Para as populações que não apresentaram frequências na base de dados NCBI se utilizou a frequência mundial.

Fonte: próprio autor.

## 7 Conclusão

O presente estudo avaliou a correlação de variantes gênicas possivelmente envolvidas com a PAA em amostras de pacientes de LLA que realizaram o tratamento com PEG ASNase. Dentre as variantes avaliadas, a presença conjunta das variantes rs17179470 de *RGS6* e rs281366 de *ULK2* apresentou significância como fator de risco para PAA. Apesar dos dados estatísticos das demais variantes não apresentarem resultados significativos, foi possível avaliar suas frequências genótípicas e alélicas dentro da população estudada que, por meio da comparação com outros estudos, se mostraram como fatores de extrema importância a serem considerados neste tipo de estudo. Ademais, a validação futura das variantes pesquisadas com um público maior e com um número maior de casos de PAA, além da inclusão de outras variantes recém relatadas, faz-se necessário para a caracterização genética precisa da população brasileira diante deste efeito adverso no tratamento de LLA.

## REFERÊNCIAS

- ABAJI, Rachid *et al.* Whole-exome sequencing identified genetic risk factors for asparaginase-related complications in childhood ALL patients. **Oncotarget**, v. 8, n. 27, p. 43752, 2017.
- ABAJI, Rachid; KRAJINOVIC, Maja. Pharmacogenetics of pan in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Drug Resistance**, v. 2, n. 2, p. 242-255, 2019.
- AHLERS, Katelin E.; CHAKRAVARTI, Bandana; FISHER, Rory A. RGS6 as a novel therapeutic target in CNS diseases and cancer. **The AAPS journal**, v. 18, n. 3, p. 560-572, 2016.
- ALAGGIO, Rita *et al.* The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1720-1748, 2022.
- AMERICAN Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2022**. Atlanta: American Cancer Society; 2022.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará-Brasil. 2007. 324p. Disponível em <https://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/> Acesso em 29 nov. 2022.
- BAI, Harrison X.; LOWE, Mark E.; HUSAIN, Sohail Z. What have we learned about acute pancreatitis in children?. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 52, n. 3, p. 262, 2011.
- BATTISTEL, Ana Paula *et al.* Allergic reactions to asparaginase: retrospective cohort study in pediatric patients with acute lymphoid leukemia. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2021.
- BISPO, Jordan A. Baeker; PINHEIRO, Paulo S.; KOBETZ, Erin K. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 10, n. 6, p. a034819, 2020.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CAVALCANTE, Matheus Santos; ROSA, Isabelly Sabrina Santana; TORRES, Fernanda. Leucemia linfóide aguda e seus principais conceitos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 151-164, 2017.

CECCONELLO, Daiane Keller *et al.* Asparaginase: An old drug with new questions. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 42, n. 3, p. 275-282, 2020.

CHAIKUAD, Apirat *et al.* Conservation of structure, function and inhibitor binding in UNC-51-like kinase 1 and 2 (ULK1/2). **Biochemical Journal**, v. 476, n. 5, p. 875-887, 2019.

CHUNXIA, Dong *et al.* Tobacco smoke exposure and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia: A meta-analysis. **Medicine**, v. 98, n. 28, 2019.

CLOTAIRE, Daguia Zambe John *et al.* MiR-26b inhibits autophagy by targeting ULK2 in prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 472, n. 1, p. 194-200, 2016.

COOK, Joselle; LITZOW, Mark. Advances in Supportive Care for Acute Lymphoblastic Leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, p. 1-18, 2020.

DENTON, C. C. *et al.* Predictors of hepatotoxicity and pancreatitis in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated according to contemporary regimens. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 65, n. 3, 2017.

EGLER, Rachel A.; AHUJA, Sanjay P.; MATLOUB, Yousif. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62, 2016.

ENCISO, Jennifer; MENDOZA, Luis; PELAYO, Rosana. Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 290, 2015.

- FELIPE-ABRIO, Blanca; CARNERO, Amancio. The tumor suppressor roles of MYBBP1A, a major contributor to metabolism plasticity and stemness. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 254, 2020.
- GEORGE, Babitha *et al.* Regulation and function of Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) in cellular senescence and pathogenesis of head and neck cancer. **Cancer Letters**, v. 358, n. 2, p. 191-199, 2015.
- GIBSON, Amber *et al.* Asparaginase-associated pancreatitis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: current perspectives. **Pediatric Drugs**, v. 23, n. 5, p. 457-463, 2021.
- GÓMEZ-MERCADO, Carlos A. *et al.* Incidencia y determinantes demográficos de la leucemia linfocítica aguda en pacientes con cáncer pediátrico, Antioquia. **Universidad y Salud**, v. 22, n. 2, p. 112-119, 2020.
- HEO, Young-A.; SYED, Yahiya Y.; KEAM, Susan J. Pegaspargase: a review in acute lymphoblastic leukaemia. **Drugs**, v. 79, n. 7, p. 767-777, 2019.
- INABA, Hiroto; MULLIGHAN, Charles G. Pediatric acute lymphoblastic leucemia. **Haematologica**, v. 105(11), p. 2524–2539, 2020.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **INCA**, Rio de Janeiro, 2019.
- INTERNATIONAL Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.
- JAZRAWI, Saad F.; BARTH, Bradley A.; SREENARASIMHAIAH, Jayaprakash. Efficacy of endoscopic ultrasound-guided drainage of pancreatic pseudocysts in a pediatric population. **Digestive diseases and sciences**, v. 56, n. 3, p. 902-908, 2011.
- JIANG, Nan *et al.* Decreased RGS6 expression is associated with poor prognosis in pancreatic cancer patients. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 7, p. 4120, 2014.
- JULIUSSON, Gunnar; HOUGH, Rachael. Leukemia. **Prog Tumor Res**. 2016; 43:87-100. doi: 10.1159/000447076. PMID: 27595359. Epub Sep 5 2016.
- KAMAL, Natasha *et al.* Asparaginase-induced hepatotoxicity: rapid development of cholestasis and hepatic steatosis. **Hepatology international**, v. 13, n. 5, p. 641-648, 2019.

- KAPLAN, Joel A. Leukemia in children. **Pediatr Rev**, v. 40, n. 7, p. 319-331, 2019.
- KATO, Motohiro; MANABE, Atsushi. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatrics International**, v. 60, n. 1, p. 4-12, 2018.
- LEBOVIC, Rachel *et al.* Adverse effects of pegaspargase in pediatric patients receiving doses greater than 3,750 IU. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 64, n. 10, p. e26555, 2017.
- LIU, Chengcheng *et al.* Clinical and genetic risk factors for acute pancreatitis in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 18, p. 2133, 2016.
- LUO, Yang *et al.* Prognostic value of regulator of G-protein signaling 6 in colorectal cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 76, p. 147-152, 2015.
- MALARD, Florent; MOHTY, Mohamad. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 395, n. 10230, p. 1146-1162, 2020.
- MENEGUETTI, Giovanna Pastore. **Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguilação**. Tese de Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- MEZEI, Gabor *et al.* Epidemiology of childhood leukemia in the presence and absence of Down syndrome. **Cancer epidemiology**, v. 38, n. 5, p. 479-489, 2014.
- MOREIRA, Larissa Aparecida; BATISTA, Silvia Caroline; DA SILVA, Joyce Beira Miranda. Diagnóstico De Leucemias Linfóides Agudas: Uma Revisão. **Revista Saúde em Foco**, ed 10, p. 279-287, 2018.
- NAKANO, Eriko *et al.* Variants in pancreatic carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, n. 8, p. G688-G694, 2015.
- NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs199695765>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.
- NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3807342>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.
- NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3809849>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.

NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs17179470>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.

NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs281366>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.

NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1358>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.

NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10514>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.

NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9706>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.

NIELSEN, Rikke L. *et al.* Can Machine Learning Models Predict Asparaginase-associated Pancreatitis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 44, n. 3, p. e628-e636, 2022.

ORSI, Laurent *et al.* Living on a farm, contact with farm animals and pets, and childhood acute lymphoblastic leukemia: pooled and meta-analyses from the Childhood Leukemia International Consortium. **Cancer medicine**, v. 7, n. 6, p. 2665-2681, 2018.

PETERSEN JR, William C. *et al.* Comparison of allergic reactions to intravenous and intramuscular pegaspargase in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric hematology and oncology**, v. 31, n. 4, p. 311-317, 2014.

PUCKETT, Yana; CHAN, Onyee; DOERR, Chaddie. Acute Lymphocytic Leukemia (Nursing). **StatPearls Publishing**, Treasure Island (FL), 2021.

RAJA, Raheel Altaf; SCHMIEGELOW, Kjeld; FRANDSEN, Thomas Leth. Asparaginase-associated pancreatitis in children. **British journal of haematology**, v. 159, n. 1, p. 18-27, 2012.

ROCHA, Andreia Possatti da *et al.* Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**, v. 51, p. 723-730, 2007.

SALZER, Wanda *et al.* Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 59, n. 8, p. 1797-1806, 2018.

SANCHEZ, Laís de Holanda Bezerra. Diagnóstico Laboratorial Das Leucemias Agudas. **Academia de Ciência e Tecnologia**, São José do Rio Preto, 2020.

SUNG, Hyuna *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SZABÓ, András *et al.* Complex formation of human proelastases with procarboxypeptidases A1 and A2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 34, p. 17706-17716, 2016.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, v. 7, n. 6, 2017.

THE Genotype-Tissue Expression (GTEx). Disponível em:

<<https://www.gtexportal.org/home/gene/CPA2>>, Acesso em: 28 de novembro 2022.

WOLTERS, B. O. *et al.* Asparaginase-associated pancreatitis: a study on phenotype and genotype in the NOPHO ALL2008 protocol. **Leukemia**, v. 31, n. 2, p. 325-332, 2017.

YAMAMOTO, J. F.; GOODMAN, M. T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997–2002. **Cancer Causes & Control**, v. 19, n. 4, p. 379-390, 2008.

ZAVYALOV, Tatyana; KHOTSYNA, Yana; TENNER, Scott. The role of antibiotics in the management of patients with acute necrotizing pancreatitis. **Current infectious disease Reports**, v. 12, n. 1, p. 13-18, 2010.

ZUCKERMAN, Tsila; ROWE, Jacob M. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. **F1000prime reports**, v. 6, 2014.

## ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**PARA CASOS**  
*RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS*

### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE: .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL: .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

### II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:  
**Ensaio para diagnóstico de fusões gênicas em leucemias agudas: uma perspectiva para o Sistema Único de Saúde.**
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:  
**André Salim Khayat**
3. DURAÇÃO DA PESQUISA:  
**36 meses**

### III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a), a participar do projeto de pesquisa (“**Ensaio para diagnóstico de fusões gênicas em leucemias agudas: uma perspectiva para o Sistema Único de Saúde**”), que será realizada no Núcleo de Pesquisa em Oncologia-UFPA.

Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de não entender bem, peça mais esclarecimento e só assine após ter certeza de ter esclarecido todas as suas dúvidas.

Rúbrica do pesquisador responsável:

Rúbrica do participante:

### IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Desenvolvimento de ensaio molecular múltiplo para diagnóstico de Leucemias Agudas em pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde.

### V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O principal produto desta pesquisa será um método promissor em termos de acessibilidade, custo reduzido e baixa complexidade laboratorial para realização do diagnóstico de Leucemias Agudas, por meio da detecção de um painel múltiplo de marcadores genéticos avaliados por ensaio laboratorial simples, mas com plena capacidade (já validado para isso por meio de duas abordagens adicionais, no sentido de aumentar a sua confiabilidade do estudo), de fornecer informações relevantes auxiliares ao diagnóstico e à conduta terapêutica dos pacientes do SUS acometidos por essas neoplasias.

Cabe ressaltar que este projeto visa auxiliar no diagnóstico das leucemias utilizando-se da classificação mais recentemente descrita para tumores hematopoiéticos, sendo a partir de 2017 considerada como padrão para uso mundial, desta forma, se aplicada pelo SUS, colocará os pacientes nacionais em semelhança aos países mais desenvolvidos socioeconomicamente, colaborando assim na redução das diferenças de taxas de mortalidade entre o Brasil e os demais países.

Além disso, os resultados desta pesquisa permitirão mapear o panorama epidemiológico molecular na população envolvida neste estudo. Ademais, fornecerá um conjunto de ferramentas necessárias para o estudo de leucemias agudas a outros centros de diagnóstico ou pesquisa, que visem auxiliar pacientes acometidos por estas doenças, isso se dará por meio de métodos de divulgação, como publicações em revistas indexadas, além de palestras e reuniões em eventos científicos.

Notoriamente, todos estes aspectos contribuirão potencialmente para a redução das taxas de morbimortalidade dos acometidos por estas doenças, o que é de imensurável relevância.

#### **VI – DE QUE FORMA POSSO AUXILIAR NESTE ESTUDO?**

Você pode auxiliar autorizando que o material já colhido para o monitoramento/diagnóstico da doença possa ser utilizado nesta pesquisa, além dos resultados dos exames e dados clínicos (idade, sexo do paciente e qual medicamento em uso) que serão também utilizados na pesquisa.

#### **VII- QUAIS OS RISCOS E LIMITES QUE PODEM SER ENCONTRADOS NOS EXAMES?**

O paciente não terá nenhum risco a mais, pois todo o procedimento é de rotina padrão do monitoramento das LLA e LMA. Qualquer risco relativo à confidencialidade é tornado praticamente inexistente, pois os dados pessoais dos pacientes são substituídos por codificações de conhecimento somente dos pesquisadores responsáveis pelo estudo.

Os resultados obtidos para essa pesquisa são absolutamente confidenciais, portanto, serão comunicados somente à pessoa (ou responsável) e ao profissional médico que acompanha o paciente. A comunicação dos resultados a terceiros só poderá ser realizada mediante autorização do interessado.

#### **VIII- COMO SERÁ FEITA ESTA PESQUISA?**

As pessoas serão convidadas a participar da pesquisa. Receberão uma cópia deste documento que deverá ser lido, entendido e assinado. Toda a atenção e exames realizados no paciente são aqueles de rotina para os pacientes direcionados a avaliação genética das LLA e LMA (não havendo qualquer tipo de ganho ou perda neste sentido). A detecção de possíveis mecanismos de resistência à abordagem terapêutica em uso (dados que será considerado na pesquisa) será realizada por critérios clínicos, de acordo com a avaliação do médico responsável. As investigações moleculares ocorrerão no Núcleo de Pesquisa em Oncologia/UFPA.

### IX- QUAIS OS BENEFÍCIOS E MALEFÍCIOS DESTE ESTUDO?

A realização deste estudo permitirá a elaboração de testes para a detecção de alterações genéticas informativas e de grande importância clínica, a serem utilizadas pelo corpo médico, que beneficiarão pacientes com leucemia e até mesmo o sistema de saúde pública. Algo que atualmente não é possível em grande parte do país, considerando a falta de acesso a estes tipos de testes por motivos econômicos ou logísticos.

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração de qualquer ordem, com a participação neste estudo. Qualquer informação gerada que venha a beneficiar clinicamente o paciente será prontamente repassada ao corpo clínico responsável pela condução do mesmo.

### X- O QUE VAI SER FEITO COM O MATERIAL E OS DADOS COLETADOS DE CADA PACIENTE?

O material e a ficha-protocolo com resultados dos exames dos pacientes serão armazenados e processados no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Oncologia/NPO.

Os pacientes que não concordarem em participar desta pesquisa não terá nenhum tipo prejuízo, em qualquer prazo, sobre seu tratamento ou atenção dispensada.

### XI. QUEM DEVE CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Qualquer dúvida ou esclarecimento adicional poderá ser resolvida por contato com o pesquisador responsável: **Dr. André Salim Khayat (Biomédico, Coordenador do estudo) pelo telefone (091) 98847\_\_\_\_\_.**

---

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_ declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

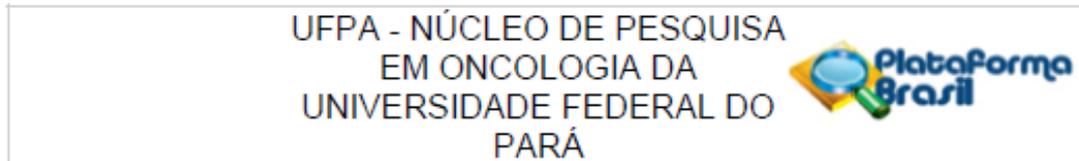
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Data

## ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA DO NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ENSAIO PARA DIAGNÓSTICO DE FUSÕES GÊNICAS EM LEUCEMIAS AGUDAS: UMA PERSPECTIVA PARA O SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE.

**Pesquisador:** André Salim Khayat

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 30307820.7.0000.5634

**Instituição Proponente:** Núcleo de Pesquisa em Oncologia

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal do Pará  
Laboratorios Servier do Brasil Ltda.

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.040.805

#### **Apresentação do Projeto:**

Estudo prospectivo com 200 pacientes portadores de LLA ou LMA, atendidos no setor de oncologia do Hospital Oncológico Infantil Octavio Lobo (HOIOL). Serão extraídos DNA e RNA de amostras de sangue ou medula óssea, e no caso do RNA será feita conversão para c-DNA, posteriormente, de acordo com o diagnóstico, será submetida a detecção de fusões gênicas. Em caso de positividade para alguma fusão, a etapa seguinte será o sequenciamento, enquanto que os casos negativos serão submetidos a avaliação por Realtime PCR. Os ensaios só serão validados, caso as amostras positivas sejam confirmadas por sequenciamento (validação qualitativa), e as amostras negativas sejam negativadas também por Realtime PCR (validação quantitativa). Todos os casos de LLA serão submetidos a avaliação do status de ploidia por citogenética convencional, visto que essa informação tem valor clínico para este tipo de leucemia.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Primário:**

Desenvolvimento de ensaio molecular múltiplo para diagnóstico de Leucemias Agudas em pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde.

##### **Objetivos Secundários:**

<b>Endereço:</b> Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON		
<b>Bairro:</b> GUAMA	<b>Município:</b> BELEM	<b>CEP:</b> 66.073-005
<b>UF:</b> PA		
<b>Telefone:</b> (91)98107-0858		<b>E-mail:</b> cep.npo@gmail.com

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA  
EM ONCOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARÁ



Continuação do Parecer: 4.040.805

- Investigar a associação da expressão de hTERT e miRNA reguladores em pacientes com leucemia ao imunofenótipo e as fusões gênicas mais significativas (como BCR-ABL, MLL-AF4, TEL-AML1, E2A3-PBX1 e SIL-TAL);
- Investigar se há semelhanças ou diferenças de expressão destes genes envolvidos na telomerase entre os pacientes pediátricos infantis (até 12 anos) ou juvenis (acima de 12 anos) ao diagnóstico;
- Avaliar a associação do tipo imunofenotípico de LLA com a expressão da miRNA dos pacientes estudados;
- Realizar uma validação metodológica quantitativa na detecção das fusões avaliadas.
- Realizar uma validação metodológica qualitativa na detecção das fusões avaliadas.
- Investigar a presença de alterações quantitativas dos genes PAX5, ETV6, RB1, BTG1, EBF1, CDKN2A-CDKN2B, região Xp22.33 (contendo PAR1, SHOX, CRLF2, CSF2RA, IL3RA e P2RY8), ZFY, JAK2 associadas ao fenótipo BCR-ABL like em Leucemia Linfóide Aguda
- Investigar as alterações numéricas cromossômicas (status de ploidia) em Leucemia Linfóide Aguda.
- Descrever um levantamento epidemiológico-molecular de alterações genéticas envolvidas na gênese de pacientes com leucemias agudas em uma região do Norte do Brasil.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O paciente não terá nenhum risco a mais, pois todo o procedimento é de rotina padrão do monitoramento das leucemias agudas. Os resultados obtidos nesta pesquisa são absolutamente confidenciais, portanto, serão comunicados somente à pessoa (ou responsável) e ao profissional médico que acompanha o paciente. Os resultados irão ajudar no desenvolvimento e padronização de um ensaio de diagnóstico molecular para ser aplicado no âmbito do Sistema Único de Saúde. Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração de qualquer ordem, com a participação neste estudo. Qualquer informação gerada que venha a beneficiar clinicamente o paciente será prontamente repassada ao corpo clínico responsável pela condução do mesmo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os pesquisadores visam obter informações relevantes auxiliares ao diagnóstico e à conduta terapêutica dos pacientes do SUS acometidos por LLA ou LMA, bem como mapear o panorama

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON  
Bairro: GUAMA CEP: 66.073-005  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)98107-0858 E-mail: oep.npo@gmail.com

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA  
EM ONCOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARÁ



Continuação do Parecer: 4.040.805

epidemiológico molecular na população envolvida na presente pesquisa. Dessa forma, o estudo poderá contribuir para redução das taxas de morbimortalidade dos pacientes acometidos por estas doenças. No TCLE os pesquisadores deixam bem claro que as amostras biológicas coletadas, serão utilizadas apenas neste estudo.

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

- Instituição proponente: Núcleo de Pesquisa em Oncologia – UFPA;
- Declaração de aceite da Instituição Coparticipante emitida em 04/12/2019;
- Folha de rosto: assinada pelo pesquisador e pela instituição proponente;
- Orçamento: despesa de custeio sem detalhamento;
- Cronograma: previsão para início de estudo em 06/04/2020;
- Tamanho total da amostra: 200 participantes;
- TALE e TCLE: necessitam de ajustes;
- Pesquisa bibliográfica: ampla e atualizada.

**Recomendações:**

Readequar o cronograma.

Configurar o TCLE e o TALE com número de páginas, e de forma que os locais destinados às assinaturas do participante ou seu representante legal, e do pesquisador não sejam colocados em folha separada. A página de assinaturas deve fazer parte do corpo do texto. O telefone do CEP e do pesquisador deve ser inserido no TALE e no TCLE.

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

Projeto em conformidade com a Resolução CNS 466/2012.  
Aprovado com recomendações.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, este Colegiado manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa por estar de acordo com a Resolução CNS nº466/2012. Em atendimento a esta resolução esclarecemos que a responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON  
Bairro: GUAMA CEP: 66.073-005  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)98107-0858 E-mail: oep.npo@gmail.com

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA  
EM ONCOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARÁ



Continuação do Parecer: 4.040.805

epidemiológico molecular na população envolvida na presente pesquisa. Dessa forma, o estudo poderá contribuir para redução das taxas de morbimortalidade dos pacientes acometidos por estas doenças. No TCLE os pesquisadores deixam bem claro que as amostras biológicas coletadas, serão utilizadas apenas neste estudo.

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

- Instituição proponente: Núcleo de Pesquisa em Oncologia – UFPA;
- Declaração de aceite da Instituição Coparticipante emitida em 04/12/2019;
- Folha de rosto: assinada pelo pesquisador e pela instituição proponente;
- Orçamento: despesa de custeio sem detalhamento;
- Cronograma: previsão para início de estudo em 06/04/2020;
- Tamanho total da amostra: 200 participantes;
- TALE e TCLE: necessitam de ajustes;
- Pesquisa bibliográfica: ampla e atualizada.

**Recomendações:**

Readequar o cronograma.

Configurar o TCLE e o TALE com número de páginas, e de forma que os locais destinados às assinaturas do participante ou seu representante legal, e do pesquisador não sejam colocados em folha separada. A página de assinaturas deve fazer parte do corpo do texto. O telefone do CEP e do pesquisador deve ser inserido no TALE e no TCLE.

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

Projeto em conformidade com a Resolução CNS 466/2012.

Aprovado com recomendações.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, este Colegiado manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa por estar de acordo com a Resolução CNS nº466/2012. Em atendimento a esta resolução esclarecemos que a responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON  
Bairro: GUAMA CEP: 66.073-005  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)98107-0858 E-mail: cep.npo@gmail.com

**UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA  
EM ONCOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARÁ**



Continuação do Parecer: 4.040.805

Cabe ao pesquisador:

- a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1367752.pdf	12/03/2020 10:28:01		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPLATAFORMABRASILmarco.pdf	12/03/2020 10:27:18	André Salim Khayat	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostoleucemia.pdf	12/03/2020 10:05:11	André Salim Khayat	Aceito
Outros	TCLECEP.pdf	27/02/2020 12:19:53	André Salim Khayat	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALECEP.pdf	27/02/2020 12:19:22	André Salim Khayat	Aceito
Outros	cephosponcologico.pdf	22/01/2020 11:32:28	André Salim Khayat	Aceito
Outros	flavia.pdf	15/01/2020 02:59:38	ELIEL BARBOSA TEIXEIRA	Aceito
Outros	LattesAlayde.pdf	29/07/2019 13:37:40	ELIEL BARBOSA TEIXEIRA	Aceito
Outros	LattesLaudreisa.pdf	29/07/2019 13:37:24	ELIEL BARBOSA TEIXEIRA	Aceito

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON  
Bairro: GUAMA CEP: 66.073-005  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)98107-0858 E-mail: cep.npo@gmail.com

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA  
EM ONCOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARÁ



Continuação do Parecer: 4.040.805

Outros	LattesFernando.pdf	29/07/2019 13:37:03	ELIEL BARBOSA TEIXEIRA	Aceito
Outros	LattesEliei.pdf	29/07/2019 13:36:43	ELIEL BARBOSA TEIXEIRA	Aceito
Outros	LattesBruna.pdf	29/07/2019 13:36:20	ELIEL BARBOSA TEIXEIRA	Aceito
Outros	LattesAndre.pdf	29/07/2019 13:35:57	ELIEL BARBOSA TEIXEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 21 de Maio de 2020

---

Assinado por:  
Carlos Onete Coelho Moreira  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4457, nas dependências do Hospital Barros Barreto, 2º piso, prédio da UNACON  
Bairro: GUAMA CEP: 66.073-005  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)98107-0858 E-mail: oep.npo@gmail.com

## ANEXO C - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP  
PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

**Projeto de Pesquisa:**  
Influência do uso de pré-medicação na atividade de PEG asparaginase em crianças em tratamento para leucemias agudas - análise prospectiva e multicêntrica em cooperação com o Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemias da Infância (GBTLI)

### Informações Preliminares

<b>Responsável Principal</b>	
CPF/Documento: 707.691.090-04	Nome: Mariana Bohns Michalowski
Telefone: 5137793657	E-mail: mariana.michalowski@gmail.com
<b>Instituição Proponente</b>	
CNPJ: 87.020.517/0001-20	Nome da Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?

A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, **NÃO** serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

É um estudo internacional?  Não

#### Assistentes

CPF/Documento	Nome
008.563.370-48	CILIANA RECHENMACHER

#### Equipe de Pesquisa

CPF/Documento	Nome
014.444.485-28	Monique Cabral Hahn
935.974.520-00	Isabel Cristina Ribas Werlang
009.124.750-05	Daiane Keller Ceconello
632.419.270-91	Liane Esteves Daudt
007.232.181-45	Klerize Aneocely de Souza Silva
438.799.690-00	Marcelo Zubarán Goldani
008.563.370-48	CILIANA RECHENMACHER
942.776.300-06	Ana Paula Alegretti

### Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Clínico

**Título Público da Pesquisa:** Influência do uso de pré-medicação na atividade de PEG asparaginase em crianças em tratamento para leucemias agudas

<b>Contato Público</b>			
CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
008.563.370-48	CILIANA RECHENMACHER	51991988042	cilianare@gmail.com

Contato Científico: Mariana Bohns Michalowski

**Desenho de Estudo / Apoio Financeiro**

Desenho do Estudo: Intervenção/Experimental

**Condições de saúde ou problemas**

Condição de saúde ou Problema
leucemia linfóide aguda

**Descritores Gerais para as Condições de Saúde**

CID1-10:Classificação Internacional de Doenças

Código CID	Descrição CID
C91.0	Leucemia linfoblástica aguda

DeCS:Descritores em Ciência da Saúde

Código DECS	Descrição DECS
D054198	Leucemia Linfoblástica de células precursoras

**Descritores Específicos para as Condições de Saúde**

CID1-10:Classificação Internacional de Doenças

Código CID	Descrição CID
C91.0	Leucemia linfoblástica aguda

DeCS:Descritores em Ciência da Saúde

Código DECS	Descrição DECS
D054198	Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras

Tipo de Intervenção: Comparador

**Natureza da Intervenção**

- Fármaco/Medicamento/Vacina

**Descritores da Intervenção**

Descritores da Intervenção

Intervenções
Randomização de uso ou não de Prémedicação antes de infusão de PEGAsparaginase

Lista de CID

Código CID	Descrição CID
C91.0	Leucemia linfoblástica aguda

Lista de DECS

Código DECS	Descrição DECS
D054198	Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras

Fase

- Fase 4

Haverá uso de placebo ou a existência de grupos que não serão submetidos em nenhuma intervenção:

Até o presente momento o protocolo de tratamento ideal é não fazer uso de premedicação antes da infusão da PEGAsparaginase evitando, assim, mascarar reações alérgicas ou inativação silenciosa. Na presença do monitoramento sérico, como será fornecido pelo presente estudo, alguns estudos unicêntricos e com poucos pacientes sugerem que o uso de pre-medicação pode reduzir o número de inativações silenciosas e, conseqüentemente, necessidade de troca de medicação. Buscaremos portanto verificar este dado de forma prospectiva e multicêntrica, com análises internas regulares.

Desenho:

Estudo prospectivo, randomizado, multicêntrico, não cego

**Apoio Financeiro**

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
42.374.207/0001-76	Laboratorios Servier do Brasil Ltda.			Institucional Principal

**Palavra Chave**

Palavra-chave
leucemia linfoblástica aguda

Data de Submissão do Projeto: 25/11/2022

Nome do Arquivo: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_2048319\_E12.pdf

Versão do Projeto: 17

criança
asparaginase
atividade asparaginase
câncer

#### Detalhamento do Estudo

##### Resumo:

Os índices de sobrevida das leucemias linfoblásticas agudas (LLA) melhoraram muito nas últimas décadas devido ao desenvolvimento de tratamentos eficazes. Hoje, as taxas de sobrevida em crianças giram em torno de 80% com uma sobrevida global superior a 90%. Infelizmente, as taxas de cura para esta mesma patologia no Brasil restam próximas a 60%. Mesmo ao se intensificar o tratamento com protocolos mais agressivos e mais seletivos, observou-se que não houve melhora dos resultados finais, mas sim um aumento de toxicidade. Um dos fármacos que têm grande influência nessa melhora é a asparaginase. A primeira descoberta das propriedades inibidoras do tumor devido à asparaginase foi há cerca de 50 anos, com a observação de que os ratos portadores de linfoma tratados com soro de cobaia apresentavam regressão tumoral rápida e muitas vezes completa. Atualmente, vários dados clínicos apoiam o uso da asparaginase como terapia nas LLA pediátricas, mostrando o seu benefício no tratamento intensivo. Ela é hoje considerada componente universal das terapias, sendo utilizada na indução e intensificação de remissão em todos os regimes de tratamento pediátrico. A asparaginase é uma enzima que esgota sistematicamente o aminoácido não essencial asparagina, levando à morte das células leucêmicas, devido aos baixos níveis de asparagina-sintetase dessas células. Atualmente, existem três formas diferentes da enzima. As duas formas nativas de asparaginase usadas inicialmente são derivadas de *Escherichia coli* ou *Erwinia crisyshemia*. A enzima derivada de *E. coli* tem sido usada como terapia de primeira linha, enquanto a asparaginase derivada de *Erwinia* é reservada para pacientes que desenvolvem reações de hipersensibilidade à forma anterior. Uma terceira formulação, a PEG Asparaginase - conjugação da *E. coli* asparaginase com o polietilenoglicol - foi desenvolvida a fim de reduzir o potencial imunogênico. Isto resultou em taxas reduzidas de formação de anticorpos, menor incidência de alergia, além de meia-vida mais prolongada no soro. A forma peguilada tem uma meia-vida de cerca de 1 semana, enquanto a asparaginase de *E. coli* nativa e a *Erwinia* asparaginase têm uma meia-vida de 1,3 e 0,85 dias, respectivamente. O monitoramento da atividade da asparaginase é um marcador importante para garantir a eficácia clínica e para justificar o eventual uso de diferentes formulações de asparaginase, ao invés de monitorar indiretamente a qualidade dos produtos por meio de pureza química. A análise dos níveis de atividade da asparaginase é fundamental para monitorar a terapia do paciente, especialmente aqueles que desenvolvem hipersensibilidade silenciosa, auxiliando na substituição dos medicamentos, melhorando o prognóstico dos pacientes. Além disso, estudos recentes apoiam que o uso de pré-medicação universal pode reduzir substituições desnecessárias e eventos adversos ao medicamento quando esse monitoramento é disponível. Através deste projeto pretendemos monitorar a atividade da asparaginase em todas as crianças brasileiras em uso de PEG asparaginase. Dessa forma, poderemos adaptar e melhorar os resultados do tratamento, além de avaliar de forma multicêntrica a influência do uso da pré-medicação na inativação silenciosa e nos eventos adversos.

##### Introdução:

As leucemias linfóides agudas (LLA) compreendem um grupo de neoplasias de células linfoblásticas que afetam principalmente crianças e adolescentes. O Instituto Nacional do Câncer (Brasil) estima que cerca de 10.000 novos casos são diagnosticados a cada ano. Ao longo do tempo, melhorias no tratamento infantil fizeram com que a taxa de cura nos países desenvolvidos hoje seja próxima a 90%, enquanto esta mesma taxa permanece em torno de 60% na população brasileira (Brandalise S, comunicação oral SOBOPE, março de 2017). A asparaginase é uma enzima derivada de bactérias que esgota sistematicamente o aminoácido não essencial asparagina. Ela causa a morte das células leucêmicas pois esta apresenta baixos níveis da enzima asparagina-sintetase. A desaminação da asparagina sérica elimina seletivamente as células de leucemia, preservando as células normais, uma vez que estas possuem a capacidade de sintetizá-la intracelularmente (Peters et al., 2011). Atualmente, existem três formas diferentes da enzima. As duas formas nativas de asparaginase usadas inicialmente são derivadas de *Escherichia coli* ou *Erwinia crisyshemia*. A enzima derivada de *E. coli* tem sido usada como terapia de primeira linha, enquanto a asparaginase derivada de *Erwinia* é reservada para pacientes que desenvolvem reações de hipersensibilidade à forma anterior. Como as preparações de asparaginase são derivadas de bactérias, elas são altamente imunogênicas. Uma terceira formulação, a PEG asparaginase, que é uma asparaginase conjugada com polietilenoglicol, foi desenvolvida a fim de reduzir a imunogenicidade e o número de infusões. É conhecido que a forma peguilada resulta em taxas reduzidas de formação de anticorpos, menor incidência de alergia e uma meia-vida mais prolongada (Silverman et al., 2001). A PEG Asparaginase tem uma meia-vida de cerca de 1 semana, enquanto a *E. coli* e *Erwinia* asparaginase têm uma meia-vida de 1,3 e 0,85 dias, respectivamente. Devido à meia-vida mais curta da *Erwinia* asparaginase são necessárias doses e aplicações mais frequentes para garantir atividade enzimática adequada e completa depleção da asparagina sérica (Fernandez et al., 2014). O monitoramento da atividade da asparaginase é um marcador importante para garantir a eficácia clínica e para justificar o eventual uso de diferentes formulações de asparaginase, ao invés de monitorar indiretamente a qualidade dos produtos por meio de pureza química. Essa estratégia já é consensual em muitos contextos, uma vez que o principal efeito adverso da medicação são as reações de hipersensibilidade e inativação silenciosa (van der Sluis et al., 2016). O desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase pode causar uma rápida inativação da asparaginase, resultando em uma depleção abaixo do ideal da asparagina. Esta condição é mais observada com a asparaginase derivada de *E. coli* e os sintomas variam desde erupção cutânea leve, prurido e até mesmo anafilaxia. Uma grande preocupação é que a produção de anticorpos nem sempre conduz a sintomas clínicos, e sim pode levar à "hipersensibilidade silenciosa" ou "inativação silenciosa" do fármaco (Panosyan et al., 2004). Estudos mostraram que pacientes com hipersensibilidade ao medicamento têm um clearance mais rápido em comparação com pacientes que não apresentam essas reações. Além disso, os pacientes que desenvolvem anticorpos neutralizantes à asparaginase, mesmo na ausência de uma reação clínica, podem ter concentrações séricas subterapêuticas da droga, levando à diminuição da sobrevida e à maior chance de recidiva da doença (Asselin, 1999). Nesses casos, é indicada a substituição da formulação com o objetivo de prolongar a terapia com asparaginase e melhorar os resultados do paciente (Zalewska-Szewczyk, 2009). Pelas razões citadas e descritas recentemente por nosso grupo (Ceconello, 2018), entendemos que a análise dos níveis de atividade da asparaginase é fundamental para monitorar a terapia do paciente, especialmente aqueles que desenvolvem hipersensibilidade silenciosa, auxiliando na substituição dos medicamentos, melhorando o prognóstico dos pacientes. Além disso, estudos recentes apoiam que o uso de pré-medicação universal pode reduzir substituições desnecessárias e eventos adversos ao medicamento quando esse monitoramento é disponível. Uma das diferenças entre a realidade brasileira e a dos países desenvolvidos é a falta de monitoramento da atividade de asparaginase. Através deste projeto pretendemos monitorar a atividade da asparaginase em todas as crianças brasileiras em uso de PEG asparaginase. Dessa forma, poderemos adaptar e melhorar os resultados do tratamento, além de avaliar de forma multicêntrica a influência do uso da pré-medicação na inativação silenciosa e nos eventos adversos.

##### Hipótese:

O uso de Pré-medicação antes da infusão da PEG Asparaginase reduz as manifestações alérgicas e a necessidade de troca de formulações de Asparaginase

##### Objetivo Primário:

Data de Submissão do Projeto: 25/11/2022	Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2048319_E12.pdf	Versão do Projeto: 17
--	---	-----------------------

Avaliar a influência da pré-medicação na atividade da PEG asparaginase em crianças brasileiras em tratamento de primeira linha para uma leucemia linfoblástica aguda. 2. Avaliar e caracterizar polimorfismos de genes relacionados à alergia à PEG asparaginase: NFATC2 (rs8021191) e GRIA1 (rs4958351) e a efeitos adversos a PEG ASNase CPA2 (rs199895765), CPA2 (rs3807342), MYBBP1A (rs3809849), RGS6 (rs17179470), ULK2 (rs281366), ULK2 (rs281366), ULK2 (rs281340), ULK2 (rs281341) e PRSS1-PRSS2 (rs62228256).

#### Objetivo Secundário:

Descrever a atividade de asparaginase e sua associação com resposta no D15 e D33, sobrevida livre de eventos (SLE) e sobrevida livre de doença (SLD); Descrever o perfil de toxicidade à Peg Asparaginase presente na população de crianças brasileira; Definir se a pré-medicação pode reduzir a taxa de reações de hipersensibilidade e inativação silenciosa secundárias à PEG-asparaginase.

#### Metodologia Proposta:

Local do estudo: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) é o maior hospital público do sul do Brasil. É um centro de tratamento de leucemia pediátrica e adulta na América Latina, com uma contribuição científica bem conhecida. Nossa equipe de pesquisa já validou em projeto anterior o monitoramento da atividade de asparaginase com centros europeus e está em constante contato para garantir a qualidade contínua de nossos resultados, principalmente com o Prof Boos, Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Universidade de Munster, Alemanha. População do Estudo e Tamanho da Amostra: Principal critério de inclusão: Pacientes de <21 anos de idade diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda em primeira linha de tratamento em uso de PEG asparaginase. Critérios de exclusão: Amostras recebidas de forma inadequada no centro de análise (HCPA): amostras não adequadamente identificadas, amostras não registradas no projeto através do REDCap, amostras que cheguem descongeladas. Serão também excluídos da análise pacientes que não sigam a randomização prevista no projeto. Coleta de dados: A coleta de dados demográficos, antropométricos, de saúde e tratamento será realizada por um questionário específico. Delineamento: Estudo prospectivo, multicêntrico, randomizado de forma centralizada ao longo de 3 anos. Os pacientes serão randomizados em dois grupos: Grupo 1: pré-medicação antes da infusão de PEG-asparaginase; Grupo 2: somente infusão de PEG-asparaginase. No grupo 1 o protocolo de pré-medicação consistirá de: 1. Difendramina 1mg/kg intravenosa (IV)-dose máxima 50mg; 2. Hidrocortisona 1mg/kg IV-dose máxima 100mg; 3. Ondansetrona 0,15mg/kg IV ou oral (VO)-dose máxima 8mg. Na ausência de difendramina, sugere-se usar maleato de dexclorfeniramina 0,4mg/ml (Crianças de 2 a 6 anos: 1,25ml três vezes ao dia, dose máxima de 3mg/dia; Crianças de 6 a 12 anos: 2,5 ml três vezes ao dia, dose máxima de 6mg/dia; Maiores de 12 anos: 5ml 3 a 4 vezes ao dia, dose máxima de 12mg/dia) ou Prometazina 0,3mg/kg IV ou intramuscular (IM). A atividade enzimática da asparaginase será analisada em ambos os grupos 7 e 14 dias após a infusão de PEG-asparaginase. Cálculo amostral e análise estatística: A amostra foi calculada usando o software WinPepi (v11.43), com um nível de significância de 5% e poder de 80%. O resultado utilizado para a base de cálculo foi a inativação da atividade sem o uso de pré-medicação antes da infusão de PEG-asparaginase a partir de dados da literatura (cerca de 1%). Com base neste cálculo, pretendemos analisar 440 pacientes, 220 em cada braço da randomização (com pré-medicação e sem pré-medicação). A randomização será aleatória simples com o auxílio do programa Excel versão 2010. Os dados coletados serão armazenados na plataforma REDCap. As análises estatísticas serão analisadas por meio do software SPSS v.20. Uma análise interina dos dados do estudo será realizada semestralmente para avaliar a correlação dos centros a partir da análise do coeficiente de correlação intraclassa (ICC), além de verificar a diferença entre os grupos intervenção (com pré-medicação) ou não e necessidade de continuidade de recrutamento. Duração do estudo: A duração estimada do estudo é de 3 anos, considerando a inclusão de aproximadamente 150 pacientes por ano. Avaliações intermediárias serão feitas regularmente para ajustar o tamanho da amostra conforme necessário. Monitoramento da atividade enzimática: Manejo das amostras: Amostras com pelo menos 2mL de sangue em EDTA serão coletadas antes, 1 hora, 7 e 14 dias após as infusões de PEG asparaginase. Todas as amostras serão centrifugadas dentro de 2 horas após a coleta e o plasma será alíquotado em tubos previamente identificados que serão imediatamente armazenados a -80 ° C até a análise. Determinação da atividade enzimática: O método de análise para a determinação da atividade enzimática é baseado na técnica descrita por Lanvers et al. (2002), que utiliza ácido aspártico B-hidroxiato como substrato para quantificação de asparaginase.

#### Critério de Inclusão:

Pacientes de <21 anos de idade diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda em primeira linha de tratamento em uso de PEG asparaginase.

#### Critério de Exclusão:

Amostras recebidas de forma inadequada no centro de análise (HCPA) : amostras não adequadamente identificadas, amostras não registradas no projeto através do REDCap, amostras que cheguem descongeladas. Serão também excluídos da análise pacientes que não sigam a randomização prevista no projeto.

#### Riscos:

Os possíveis riscos adicionais decorrentes da participação na pesquisa são relacionados ao uso da pré-medicação, para os participantes que forem sorteados para este grupo. Para os participantes que forem sorteados para participar no grupo do tratamento padrão, não há riscos adicionais pela participação na pesquisa, apenas os riscos relacionados ao tratamento assistencial conforme já explicado pelo médico assistente.

#### Benefícios:

Assistência à saúde: adaptação do tratamento individual do paciente, garantindo boas práticas médicas, potencializando a resposta ao tratamento e melhorando o prognóstico; Tecnologia: aplicação de uma metodologia reconhecida internacionalmente dentro da realidade nacional; Social: redução do risco de recidiva e re-tratamento desses pacientes, redução de custos individuais, familiares e sociais, bem como a toxicidade, permitindo uma reinserção social;

#### Metodologia de Análise de Dados:

A randomização será aleatória simples com o auxílio do programa Excel versão 2010. Os dados coletados serão armazenados na plataforma REDCap (Research Electronic Data Capture) As análises estatísticas serão analisadas por meio do software SPSS v.20. Uma análise interina dos dados do estudo será realizada semestralmente para avaliar a correlação dos centros a partir da análise do coeficiente de correlação intraclassa (ICC), além de verificar a diferença entre os grupos intervenção (com pré-medicação) ou não e necessidade de continuidade de recrutamento.

#### Desfecho Primário:

Avaliação da inativação silenciosa da asparaginase em pacientes pediátricos com LLA usando PEG-Asp no Brasil

#### Desfecho Secundário:

A Sobrevida Livre de Eventos (SLE) será calculada a partir do momento do diagnóstico até a data da recidiva ou medula óssea M2 após ter alcançado uma remissão completa (RC); falha em alcançar RC no final do tratamento, segunda malignidade ou morte por qualquer causa, o que ocorrer primeiro. Indivíduos que não conseguem atingir RC após o tratamento serão consideradas falhas de tratamento e será atribuído um SLE com duração de 1 dia. Os indivíduos ainda vivos e livres de eventos serão censurados na última data de avaliação da doença. Se a data da última avaliação da doença for posterior à data que aciona a análise, o indivíduo será censurado na data de início da análise. Sobrevida global (SG) será calculada a partir do tempo de diagnóstico até a morte por qualquer causa. Indivíduo ainda vivo será censurado na data que se sabe que está vivo. Se a data conhecida pela última vez por estar vivo for posterior à data que

aciona a análise, o indivíduo será censurado na data do início da análise Resposta de doença residual mínima (DRM): Definido como nível de DRM < 10-4 no final do tratamento Incidência cumulativa de recaída Incidência de inativação de asparaginase Comparar a incidência de reações de hipersensibilidade com PEG-asparaginase com e sem pré-medicação

Tamanho da Amostra no Brasil: 440

#### Países de Recrutamento

País de Origem do Estudo	País	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	440

#### Outras Informações

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Sim

Detalhamento:

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

440

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Com prémedicação	220	Uso de antialérgicos antes da infusão de PEG-Asparaginase
Sem prémedicação	220	Nenhuma

O Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Sim

Demais Centros Participantes no Brasil

CNPJ: 17.209.891/0001-93	Nome/Orgão/Unidade: SANTA CASA DE MISERICORDIA DE BELO HORIZONTE
E-mail: cep@santacasabh.org.br	Telefone: 3132388838
CPF do Responsável: 05203512883	Nome do Responsável: MARINA BRANDAO DONNARD
CNPJ: 60.961.968/0001-06	Nome/Orgão/Unidade: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE
E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br; lp_kowalski@uol.com.br	Telefone: 1121896025
CPF do Responsável: 56298218300	Nome do Responsável: NEVIÇOLINO PEREIRA DE CARVALHO FILHO
CNPJ: 06.870.026/0001-77	Nome/Orgão/Unidade: ASSOCIAÇÃO PIAUIENSE DE COMBATE AO CÂNCER
E-mail:	Telefone: 8621088000
CPF do Responsável: 83207473768	Nome do Responsável: MONICA FORTES NAPOLEAO DO REGO
CNPJ: 92.736.040/0008-90	Nome/Orgão/Unidade: SOCIEDADE LITERARIA E CARITATIVA SANTO AGOSTINHO
E-mail: cep@hsjose.com.br	Telefone: 4834311528
CPF do Responsável: 04189218901	Nome do Responsável: Juliana Dal Ponte Bitencourt
CNPJ: 60.448.040/0001-22	Nome/Orgão/Unidade: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
E-mail: cappelq@honet.usp.br	Telefone: 1126616442
CPF do Responsável: 08360356823	Nome do Responsável: Lilian Maria Cristófani
CNPJ: 81.270.548/0001-53	Nome/Orgão/Unidade: UNIAO OESTE PARANAENSE DE ESTUDOS E COMBATE AO CANCER
E-mail: hospitaldocancer@uopecan.com.br	Telefone: 4521017000
CPF do Responsável: 42690919400	Nome do Responsável: CARMEM MARIA COSTA MENDONÇA FIORI
CNPJ: 95.591.764/0014-20	Nome/Orgão/Unidade: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
E-mail:	Telefone:
CPF do Responsável: 44687001088	Nome do Responsável: Mauber Eduardo Schultz Moreira
CNPJ: 67.185.694/0001-50	Nome/Orgão/Unidade: GRUPO DE APOIO AO ADOLESCENTE E A CRIANCA COM C GRAACC
E-mail:	Telefone:
CPF do Responsável: 82548943372	Nome do Responsável: Ana Virginia Lopes de Sousa

Data de Submissão do Projeto: 25/11/2022

Nome do Arquivo: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_2048319\_E12.pdf

Versão do Projeto: 17

CNPJ: 11.636.872/0001-87	Nome/Orgão/Unidade: FUNDAÇÃO HOSPITAL REGIONAL DO CANCER DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PRESIDENTE PRUDENTE
E-mail:	Telefone: 1832220083
CPF do Responsável: 27789167847	Nome do Responsável: Danielle Francisco Honorato de Barros Torelli
CNPJ: 15.170.723/0001-06	Nome/Orgão/Unidade: LIGA ALVARO BAHIA CONTRA A MORTALIDADE INFANTIL
E-mail:	Telefone: 7133249700
CPF do Responsável: 97917117634	Nome do Responsável: juliana teixeira costa

Propõe dispensa do TCLE?

Não

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Não

#### Finalizar

Manter sigilo da íntegra do projeto de pesquisa: Sim

Prazo: Até a publicação dos resultados

Justificativa da Emenda:

À Coordenação Comitê de Ética em Pesquisa Projeto CAAE: 32764720.9.1001.5327- Título da Pesquisa: Influência do uso de prémedicação na atividade de PEG asparaginase em crianças em tratamento para leucemias agudas. Porto Alegre 11/11/ 2022. Prezados Senhores, Solicitamos através desta emenda a inclusão de pacientes que foram diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e que fizeram uso da medicação Peg Asparaginase nos últimos 4 anos, e apresentaram reação adversa, necessariamente a pancreatite, e ainda estão em acompanhamento ambulatorial nesta instituição. Para estes pacientes precisamos de uma coleta de swab oral para as análises dos genes relacionados à pancreatite. O convite para participar da pesquisa e a coleta serão realizadas no momento da consulta ambulatorial do paciente. As alterações estão destacadas no projeto e no novo TCLE. Atenciosamente, Mariana Bohns Michalowski