



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

BRUNA VASCONCELOS DE ALCÂNTARA

**IMPACTO CLÍNICO DA EXPRESSÃO DO GENE *ID1* NA LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA**

Recife
2024

BRUNA VASCONCELOS DE ALCÂNTARA

**IMPACTO CLÍNICO DA EXPRESSÃO DO GENE *ID1* NA LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Recife

2024

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

Alcântara, Bruna Vasconcelos de.

Impacto clínico da expressão do gene ID1 na leucemia promielocítica aguda. / Bruna Vasconcelos de Alcântara. – 2024.

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

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo.
Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

.

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

Inclui referências.

1. ID1. 2. Prognóstico. 3. IC-APL. I. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (Orient.). II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Coorient.). III. Título.

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-074

BRUNA VASCONCELOS DE ALCÂNTARA

**IMPACTO CLÍNICO DA EXPRESSÃO DO GENE *ID1* NA LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

.

Aprovado em: 29/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Diego Antonio Pereira Martins (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico aos meus pais, Fátima e Marcos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo. Nesses dois anos de mestrado, sinto-me muitíssimo abençoada por ter pessoas incríveis ao meu lado. Não foi uma caminhada fácil, mas ter uma rede de apoio espetacular tornou tudo isso possível: meus pais, Fátima e Marcos, os maiores incentivadores que eu poderia ter, e a base para a minha dedicação aos estudos. Agradeço também aos meus irmãos, Guilherme e Marcos Jr., e a minha avó, Terezinha, que sempre torceram tanto por mim.

Ao Prof. Antonio Roberto, agradeço pela paciência em busca da resolução dos problemas que surgiram, pelo seu comprometimento como orientador, e principalmente por acreditar no potencial do meu trabalho. Ao Prof. Marcos André, meu coorientador, agradeço às primeiras oportunidades que o senhor me proporcionou. Os senhores são grandes exemplos de profissionais para todos que cruzam os seus caminhos. Aqui também deixo os meus agradecimentos aos excelentes profissionais do Laboratório Central da UFPE.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPE que me trouxe muitos aprendizados, *networking* e crescimento profissional. Manifesto, também, a minha gratidão às pessoas que o constitui. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), agradeço pelo financiamento fornecido.

Esse parágrafo é inteiramente dedicado aos meus amigos. Ao Time NHCL: Carlos, João e Paloma, além das nossas demandas e parceria profissional, vocês foram irretocáveis nos momentos em que eu precisei de um pouco mais de leveza. Às minhas amigas da infância, Larissa, Mariah, Jessica e Thaís, obrigada por estarem sempre comigo. Por último e não menos importante, agradeço aos amigos que pude

fazer nesses últimos anos no LABCEN: Amanda, Vitória, Adriana, Lidianne, Izabel e Márcio, desejo muito sucesso na vida de todos vocês.

“Mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam bem alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam”. (Bíblia, Isaías 40:31).

RESUMO

O *inibidor de ligação ao DNA 1 (ID1)* tem sido frequentemente associado com início e progressão de diversos tumores humanos. Na leucemia mieloide aguda, um crescente número de evidências sugere que a alta expressão desse gene pode afetar tanto a leucemogênese quanto o prognóstico dos pacientes. No entanto, pouco se sabe sobre o seu papel na leucemia promielocítica aguda (LPA), uma doença que, embora tenha um prognóstico favorável, um número significativo de pacientes ainda sofre recaída quando tratados com ácido *all-trans* retinóico (ATRA) e quimioterapia. Nosso trabalho investigou a importância clínica da expressão aberrante do gene *ID1* em 226 amostras de medula óssea de pacientes com LPA tratados com ATRA e quimioterapia. Pacientes com alta expressão de *ID1* tiveram uma menor sobrevida global (SG) (41%, intervalo de confiança, IC 95%: 28–54%), quando comparados aos pacientes com baixa expressão de *ID1* (83%, IC 95%: 76–89%) ($p < 0,001$). De forma semelhante, pacientes de alto risco (ou seja, aqueles com contagem de leucócitos $> 10 \times 10^9/L$) com alta expressão de *ID1* apresentaram uma taxa de SG significativamente menor (23%, IC 95%: 8–42) do que aqueles com baixa expressão de *ID1* (62%, IC 95%: 45–75) ($p = 0,0047$). Deste modo, concluímos que a expressão aberrante do *ID1* tem impacto prognóstico na LPA, pelo menos quando o tratamento é à base de ATRA e quimioterapia. Além disso, esses resultados podem ser úteis para refinar a estratificação de risco de acordo com o perfil molecular do paciente.

Palavras-chave: *ID1*; prognóstico; IC-APL.

ABSTRACT

The *inhibitor of DNA binding 1 (ID1)* is frequently associated with the initiation and progression of various human tumors. In acute myeloid leukemia, accumulating evidence suggests that high expression of this gene may influence both leukemogenesis and patient prognosis. However, little is known about its role in acute promyelocytic leukemia (APL), a disease that with a generally favorable prognosis, but where a significant number of patients are still relapse when treated with all-trans retinoic acid (ATRA) and chemotherapy. Our study aimed to investigate the clinical importance of the aberrant *ID1* gene expression in 226 bone marrow samples from APL patients treated with ATRA and chemotherapy. We found that patients with high *ID1* expression had a lower overall survival (OS) rate (41%, confidence interval, 95% CI: 28–54%) compared to those with low *ID1* expression (83%, 95% CI: 76 –89%) ($P<0.001$). Similarly, high-risk patients (i.e., those with leukocyte count $>10\times10^9/L$) with high *ID1* expression had a significantly lower OS rate (23%, 95% CI: 8–42) than those with low *ID1* expression (62%, 95% CI: 45–75) ($P=0.0047$). Therefore, we conclude that aberrant expression of *ID1* has a prognostic impact on APL, at least in a scenario in which ATRA+chemotherapy constitutes the basis for treatment. Additionally, these finding may contribute to refining risk stratification based on patient's molecular profile.

Key words: *ID1*; prognostication; IC-APL.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Classificação das LMAs com porcentagem de blastos necessários para diagnóstico	18
Quadro 2 –	Categoria de risco pela ELN, segundo as alterações genéticas	19
Quadro 3 –	Estratificação de risco de recaída na LPA segundo os critérios do grupo PETHEMA-GIMEMA	31
Quadro 4 –	Estratificação de risco de recaída na LPA e tratamento de primeira linha	32
Quadro 5 –	Sensibilidade ao ATRA e ATO dos 12 genes de fusão envolvendo <i>RARα</i> que foram reconhecidos até o momento, excluindo <i>PML-RARα</i>	38
Figura 1 –	(a) Localização precisa do <i>PML</i> em 15q24.1. (b) Representação esquemática mostrando os domínios do gene <i>PML</i> e as funções de cada um	22
Figura 2 –	(a) Localização precisa do <i>RARα</i> 17q21.2 (b) Representação esquemática mostrando os seis domínios do gene <i>RARα</i> e as funções de cada um	23
Figura 3 –	Representação esquemática da patogênese da LPA promovida por <i>PML/RARα</i>	24
Figura 4 –	Disfunção hemostática na leucemia promielocítica aguda	27
Figura 5 –	Tipos morfológicos de LPA	30
Figura 6 –	Evolução da terapia na LPA	33
Figura 7 –	ATRA participa da ativação transcricional de genes relacionados à diferenciação	42
Figura 8 –	Composição genética de <i>ID1</i>	42
Figura 9 –	<i>ID1</i> em diferentes vias associadas ao câncer	46
Figura 10 –	Distribuição das curvas de sobrevida global de acordo com os grupos de quartis com probabilidades de eventos semelhantes	56
Figura 11 –	Expressão de <i>ID1</i> nos grupos de alta e baixa expressão	57

Figura 12 – Comparação da sobrevida global (Figura 12A) e 60
sobrevivência livre de doença (Figura 12B)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características clínicas e biológicas de pacientes com LPA de acordo com a expressão gênica de <i>ID1</i>	57
Tabela 2 –	Análise multivariada de Cox para sobrevida global e sobrevida livre de doença	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATRA	Ácido <i>all-trans</i> retinóico
ATO	Trióxido de arsênio
BCR	do inglês, <i>breakpoint cluster region</i>
bHLH	Fatores básicos de transcrição hélice-alça-hélice
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
cDNA	DNA complementar
CTH	Célula-tronco hematopoética
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dntp	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DRM	Doença residual mínima
ECOG	do inglês, <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELN	do inglês, <i>European LeukemiaNet</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAB	Grupo Franco-Américo-Britânico
<i>FLT3</i>	do inglês, <i>FMS-Related Tyrosine Kinase</i>
<i>GAPDH</i>	do inglês, <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

IC-APL	do inglês, <i>International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia</i>
ICR	Incidência cumulativa de recaída
ID	Proteína inibidora de ligação ao DNA
<i>ID1</i>	Gene Inibidor de ligação ao DNA 1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
MO	Medula óssea
NaCl	Cloreto de sódio
Ng	Nanograma
<i>NPM1</i>	do inglês, <i>Nucleophosmin</i>
PBS	do inglês, <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PMLZF</i>	do inglês, <i>Promyelocytic Leukemia Zinc Finger</i>
<i>PML-RARA</i>	Gene de fusão envolvendo o gene <i>PML</i> e o gene <i>RARα</i>
RC	Remissão completa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNAseq	Sequenciamento de RNA
Rpm	Rotação por minuto

RT-PCR	do inglês, <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
t(15;17)(q22;q21)	Translocação cromossômica envolvendo o braço longo do cromossomo 15 e o braço longo do cromossomo 17
TE	Tris-EDTA
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tpa	Ativador do plasminogênio tecidual
uPA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
UV	Ultravioleta
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	16
2.2	LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA	20
2.2.1	Manifestações clínicas	26
2.2.2	Diagnóstico	28
2.2.3	Classificação de risco	31
2.2.4	Tratamento	32
2.2.5	Tratamento da LPA no Brasil	39
2.3	O GENE <i>ID1</i>	42
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	CASUÍSTICA E PROTOCOLO DE TRATAMENTO	49
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	49
4.3	QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL	50
4.4	SÍNTESE DE PRIMEIRA FITA DO DNA COMPLEMENTAR	51
4.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>ID1</i>	51
4.6	ESTRATÉGIA DE DICOTOMIZAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4.7	DESFECHOS	54
5	RESULTADOS	56
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	65
8	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O gene *ID1* (*Inibidor de ligação ao DNA 1*) está localizado no braço longo do cromossomo 20 (*locus*: 20q11.21). A proteína resultante da sua codificação é pertencente ao grupo das inibidoras de ligação ao DNA (IDs), sendo *ID1* o tipo mais estudado dentre elas. A *ID1* atua como antagonista dos fatores básicos de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH), inibindo a ligação desses fatores ao DNA e atividade transcricional. Dessa forma, *ID1* tem função importante na regulação de genes específicos relacionados a proliferação, diferenciação, crescimento e angiogênese celular.

A expressão aberrante de *ID1* tem sido frequentemente associada ao início e progressão de diversos tumores humanos. Sobretudo na leucemia mieloide aguda, um crescente número de evidências sugere que a superexpressão de *ID1* pode afetar a leucemogênese e conferir aos pacientes um pior prognóstico, com menores sobrevida livre de doença e sobrevida global. Demonstramos, recentemente, que a alta expressão de *ID1* estava associada a maus resultados de indução em pacientes com leucemia mieloide aguda (excluindo a leucemia promielocítica aguda, LPA) tratados fora de estudos clínicos controlados. No entanto, até o momento, o impacto nos principais desfechos clínicos da expressão de *ID1* em pacientes com LPA nunca foi explorado.

A esse respeito, a LPA corresponde a cerca de 10-15% dos casos de leucemias mieloides agudas. A doença também se comporta como o tipo de leucemia mais curável atualmente, devido ao avanço do tratamento nos últimos 40 anos: ao utilizar os agentes diferenciadores ácido *all-trans* retinóico (ATRA) e o trióxido de arsênio (ATO), para os grupos de risco intermediário/baixo, sem o uso de quimioterapia citotóxica. Contudo, pacientes de alto risco, definidos como tendo uma contagem de

leucócitos ao diagnóstico superior a 10.000/ μ L, são menos responsivos à quimioterapia citotóxica e possuem altas taxas de recaída quando comparadas com pacientes de baixo risco ou risco intermediário. Ademais, nos países em desenvolvimento, a terapia com ATO ainda não é utilizada na prática clínica. Nesse contexto, a investigação de novos alvos terapêuticos vem sendo feita para aumentar a quimiossensibilidade das células leucêmicas.

Diante do exposto, o nosso trabalho investigou a importância clínica da expressão de *ID1* em pacientes com LPA por meio de uma análise exploratória descritiva. Para, deste modo, subclassificar pacientes de alto risco e identificar aqueles que necessitem ser monitorados e tratados com protocolos alternativos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica maligna que se caracteriza pelo acúmulo de progenitores mieloides na medula óssea e no sangue periférico. Se desenvolve a partir de alterações genéticas esporádicas nas células-tronco hematopoéticas (CTHs), bem como em outros progenitores mieloides com capacidade de autorrenovação e propagação do clone leucêmico (Döhner *et al.*, 2022). Na maioria dos casos, a LMA aparece *de novo* em uma pessoa anteriormente saudável. A etiologia exata das mutações genéticas ainda é desconhecida, entretanto, alguns fatores como a exposição à radiação ionizante, agentes quimioterápicos e tabagismo estão associados ao risco para a doença. A LMA também pode evoluir a partir de distúrbios mieloproliferativos, síndrome mielodisplásica (SMD), hemoglobinúria paroxística noturna e anemia aplástica (Vakiti *et al.*, 2023).

A incidência da LMA é superior a 20.000 casos por ano nos Estados Unidos (EUA) e é mais frequente em adultos, com idade média ao diagnóstico de 70 anos (Liang *et al.*, 2021; Vakiti *et al.*, 2023). Dados epidemiológicos dos EUA mostraram que a incidência da doença nos pacientes adultos era maior do que em qualquer um dos outros 3 subtipos de leucemia (leucemia linfóide aguda, leucemia mieloide crônica e leucemia linfóide crônica) até 2017 (Song *et al.*, 2018; Shallis *et al.*, 2019). No Brasil, as leucemias são relatadas estatisticamente como uma entidade única pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), dessa forma, as informações acerca dos novos casos de LMA não estão disponíveis.

A sobrevida global estimada em 5 anos da LMA é de aproximadamente 30% (SEER, 2022). E os fatores relacionados ao prognóstico abrangem a contagem de

leucócitos ao diagnóstico, evolução a partir de síndrome mielodisplásica, administração de terapia citotóxica para tratar outras doenças e alterações citogenéticas e moleculares nas células leucêmicas ao diagnóstico (Zago *et al.*, 2013).

A idade mais avançada ao diagnóstico é um dos principais fatores para uma pior sobrevida na LMA. O que pode explicar esse efeito é a associação entre o aumento da idade e alguns fatores preditivos de mortalidade precoce, dentre os quais: a ocorrência simultânea de comorbidades, maior frequência de alterações cromossômicas que conferem um prognóstico adverso, LMA secundária e positividade para proteínas de resistência a múltiplas drogas (Zago *et al.*, 2013). A escala de *Eastern Cooperative Oncologic Group (ECOG)* avalia o desempenho clínico, ou, em inglês, *performance status*, atuando como fator prognóstico importante, em especial em pacientes com idade superior a 60 anos (Oken *et al.*, 1982; Zago *et al.*, 2013).

Reconhecida como uma doença altamente heterogênea, a LMA se divide em subgrupos baseados em características morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares distintas. A 5ª classificação mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou algumas modificações importantes em relação à classificação de 2016, incluindo a definição de um novo ponto de corte $\geq 10\%$ de blastos para as LMAs com alterações recorrentes, exceto pelas LMAs com *BCR/ABL* e LMAs com *CEBPA* mutado. Ademais, enquanto a presença de neoplasia mieloide prévia ou predisposição germinativa eram entidades específicas da LMA na categorização anterior, estas passaram a ser consideradas como qualificadoras para o diagnóstico (Quadro 1) (Arber *et al.*, 2022).

Quadro 1 – Classificação das LMAs com porcentagem de blastos necessários para diagnóstico.

Leucemia mieloide aguda com anormalidades genéticas recorrentes - Leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17)(q24.1;q21.2)/ <i>PML::RARα</i> ≥ 10% - LPA com outros rearranjos <i>RARα</i>* ≥ 10% - LMA com t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> ≥ 10% - LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> ≥ 10% - LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> ≥ 10% - LMA com outros rearranjos <i>KMT2A</i> † ≥ 10% - LMA com t(6;9)(p22.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> ≥ 10% - LMA com inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2;MECOM (EVI1)</i> ≥ 10% - LMA com outros rearranjos <i>MECOM</i> ‡ ≥ 10% - LMA com outras translocações recorrentes raras ‡ ≥ 10% - LMA com t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> ≥ 20% - LMA com <i>NPM1</i> mutado ≥ 10% - LMA com mutações <i>in-frame</i> bZIP <i>CEBPA</i> ≥ 10% - LMA com <i>TP53</i> mutado † ≥ 20%
LMA com anormalidades citogenéticas relacionadas à mielodisplasia ≥ 20% LMA com mutações genéticas relacionadas à mielodisplasia ≥ 20%
LMA não especificada ≥ 20%
Sarcoma mieloide

*Incluem LMAs com t(1;17)(q42.3;q21.2)/*IRF2BP2::RARα*; t(5;17)(q35.1;q21.2)/*NPM1::RARα*; t(11;17)(q23.2;q21.2)/*ZBTB16::RARα*; inversão críptica(17q) ou del(17)(q21.2;q21.2)/*STAT5B::RARα,STAT3::RARα*; Outros genes raramente rearranjados com *RARα:TBL1XR1* (3q26.3), *FIP1L1* (4q12), *BCOR* (Xp11.4).

†Incluem LMAs com t(4;11)(q21.3;q23.3)/*AFF1::KMT2A*; t(6;11)(q27;q23.3)/*AFDN::KMT2A*; t(10;11)(p12.3;q23.3)/*MLLT10::KMT2A*; t(10;11)(q21.3;q23.3)/*TET1::KMT2A*; #; t(11;19)(q23.3;p13.1)/*KMT2A::ELL*; t(11;19)(q23.3;p13.3)/*KMT2A::MLLT1* (ocorre predominantemente em lactentes e crianças).

‡ Incluem LMAs com t(2;3)(p11~23;q26.2)/*MECOM::?*; t(3;8)(q26.2;q24.2)/*MYC,MECOM*; t(3;12)(q26.2;p13.2)/*ETV6::MECOM*; t(3;21)(q26.2;q22.1)/*MECOM::RUNX1*.

Fonte: Arber e colaboradores (2022).

O tratamento padrão da LMA exige uma quimioterapia inicial de indução baseada em três dias de antraciclina e sete dias de citarabina (protocolo 3+7), com o objetivo de atingir a remissão completa (RC) (<5% de blastos na medula óssea). Em

seguida, para erradicar a doença residual mínima (DRM) é realizada uma terapia de pós-remissão. São preconizados ciclos repetitivos de doses de citarabina na terapia de consolidação com ou sem tratamento prolongado de manutenção (Ministério da Saúde, Brasil, 2014).

No entanto, houve um progresso substancial no conhecimento sobre a LMA, principalmente no âmbito do valor clínico das anormalidades genéticas, citogenéticas e desenvolvimento de novas terapias direcionadas. Com base nisso, a Rede Europeia de Leucemia (ELN) (do inglês, *European LeukemiaNet*) estabeleceu uma nova classificação de risco para a escolha do tratamento na LMA (Quadro 2) (Döhner *et al.*, 2017; Döhner *et al.*, 2022).

Quadro 2 – Categoria de risco pela ELN, segundo as alterações genéticas.

Categoria de risco	Anormalidades genéticas ELN 2017	Anormalidades genéticas ELN 2022
Favorável	t(8;21)(q22;q22.1);/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> ; inv(16)(p13.1;q22 ou t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB-MYH11</i> ; <i>NPM1</i> mutado sem mutação do <i>FLT3-ITD</i> ou <i>FLT3-ITD</i> ^{baixo} ; Mutação bial�lica do <i>CEBPA</i> .	t(8;21)(q22;q22.1);/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> ; inv(16)(p13.1;q22 ou t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB-MYH11</i> ; <i>NPM1</i> mutado sem mutação do <i>FLT3-ITD</i> ; mutação <i>in-frame</i> do bZIP do <i>CEBPA</i> .
Intermediário	<i>NPM1</i> mutado com mutação do <i>FLT3-ITD</i> ^{alto} ; <i>NPM1</i> selvagem sem mutação do <i>FLT3-ITD</i> ou <i>FLT3-ITD</i> ^{baixo} ; t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> ; Anormalidades citogen�ticas não classificadas em risco favorável ou adverso.	<i>NPM1</i> mutado com mutação do <i>FLT3-ITD</i> ; <i>NPM1</i> selvagem com mutação do <i>FLT3-ITD</i> ; t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> ; outras anormalidades gen�ticas e/ou moleculares não classificadas como favorável ou adversa.

Adverso	t(6;9)(p23;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> ; t(v;11q23.3)/ <i>KMT2A</i> rearranjado; t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> ; inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2;MECOM(EVI1)</i> ; -5, ou del(5q); -7; -17/abn(17p); Cariótipo complexo ou monossômico; <i>NPM1</i> selvagem com <i>FLT3-ITD^{alto}</i> ; Mutação em <i>ASXL1</i> , <i>RUNX1</i> ou <i>TP53</i> .	t(6;9)(p23;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> ; t(v;11q23.3)/ <i>KMT2A</i> rearranjado; t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> ; inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2;MECOM(EVI1)</i> ; t(3q;26.2;v)/ <i>MECOM(EVI1)</i> ; rearranjado; -5, ou del(5q); -7; -17/abn(17p); Cariótipo complexo ou monossômico; Mutação do <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> e/ou <i>ZRSR2</i> ; Mutação do <i>TP53</i> .
---------	--	--

Fonte: Modificado de Döhner *et al.* (2017; 2022).

O transplante alogênico de células-tronco possibilita a única cura potencial para alguns pacientes com LMA, com uma taxa de sobrevida a longo prazo que varia de 10%-70%, considerando fatores como dados demográficos do paciente, variáveis clínicas, anormalidades genéticas e DRM. Contudo, diversas condições podem influenciar na decisão de submissão a um transplante de medula óssea. Se o paciente estiver categorizado no grupo citogenético de “alto risco” ou “risco intermediário”, ou apresentar DRM após a indução, recomenda-se um transplante na primeira remissão completa ou obtenção da resposta máxima. Por outro lado, se o risco citogenético for “favorável”, um transplante na primeira remissão geralmente não é recomendado. Vários estudos apoiam os benefícios do transplante alogênico de células-tronco em casos de risco adverso e intermediário, mas não em citogenética de risco favorável (Roman *et al.*, 2024).

2.2 LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

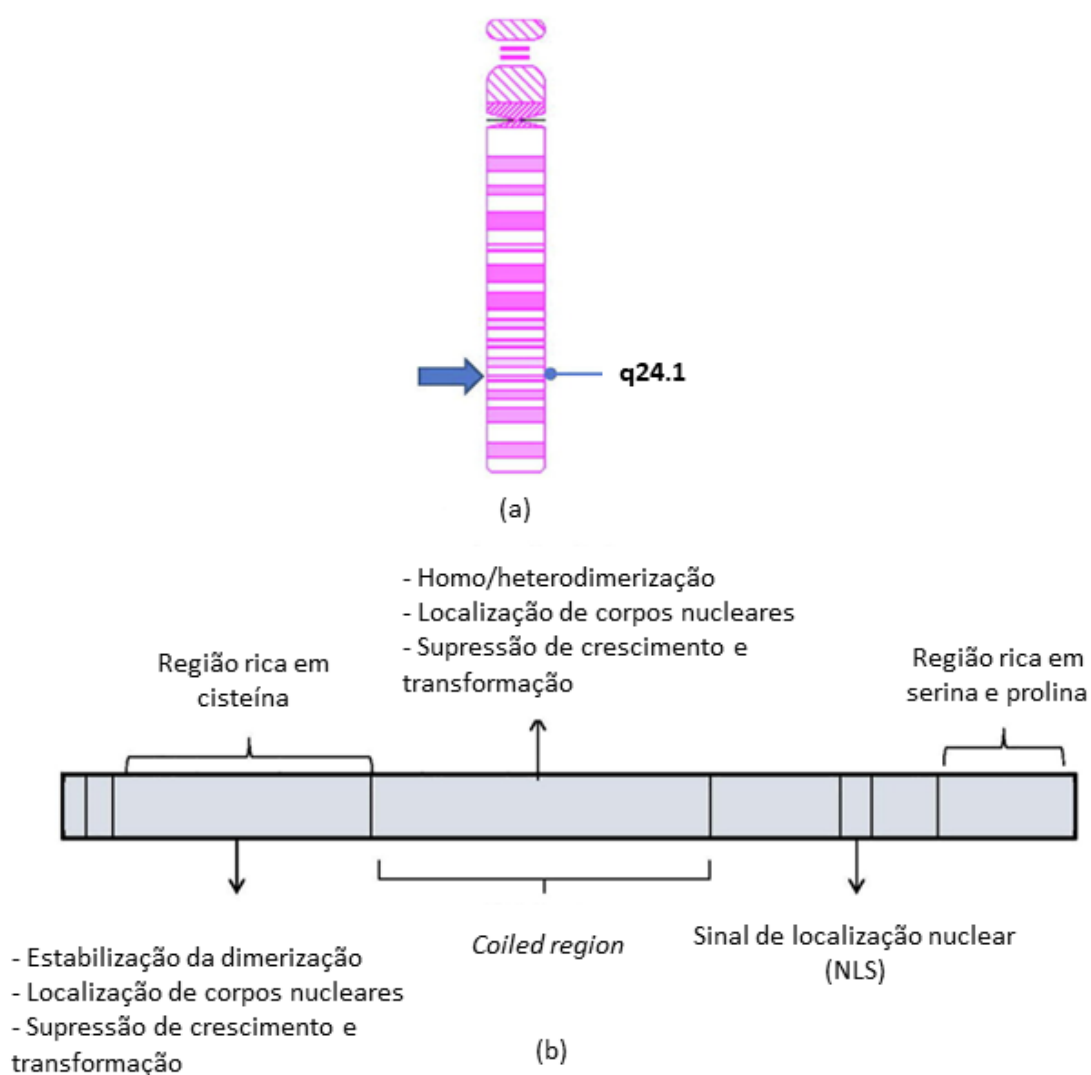
A leucemia promielocítica aguda (LPA) corresponde a um subtipo particular de doença que representa cerca de 20 a 25% das LMAs nos países latino-americanos (Rego & Jácomo, 2011). Essa singularidade é explicada pelas características biológicas, morfológicas e curso clínico distintos dos demais grupos. De acordo com a classificação morfológica estabelecida pela FAB (franco-américo-britânica), a LPA corresponde ao subtipo M3 pela infiltração da medula óssea e/ou sangue periférico por promielócitos anômalos, eventualmente associada à trombocitopenia secundária a agregados plaquetários (Bennett *et al.*, 1976; Greer *et al.*, 2014).

De maneira oposta às LMAs, que apresentam uma incidência maior em idosos, os pacientes com LPA são muito mais jovens, com uma média de 30-40 anos de idade ao diagnóstico (Liang *et al.*, 2021).

No final da década de 1970, grupos americanos e europeus observaram a translocação recíproca e balanceada característica da LPA vista em 95-98% dos casos. Foi originalmente definida como $t(15;17)(q22;q21)$, mas atualmente é referida como $t(15;17)(q24;q21)$ porque o gene *PML* está localizado na banda 15q24 (Rowley *et al.*, 1977; Van Den Berghe *et al.*, 1979; Abdul *et al.*, 2020; Jimenez *et al.*, 2020). No cromossomo 15, a quebra ocorre no gene *PML* codificador da proteína da leucemia promielocítica (localizada numa região nuclear específica, chamada corpos nucleares, do inglês, *nuclear bodies*), e que possui alguns motivos como *coiled region* e motivo ricos em cisteína que são responsáveis pela interação proteína-proteína com inúmeras parceiras de interação presentes no núcleo e no citoplasma das células (Figura 1). O outro gene envolvido nessa translocação é o receptor α transretinoico ($RAR\alpha$), localizado no cromossomo 17 que codifica para um receptor de hormônio nuclear, o receptor de ácido retinóico, derivado da vitamina A. Esse fator de

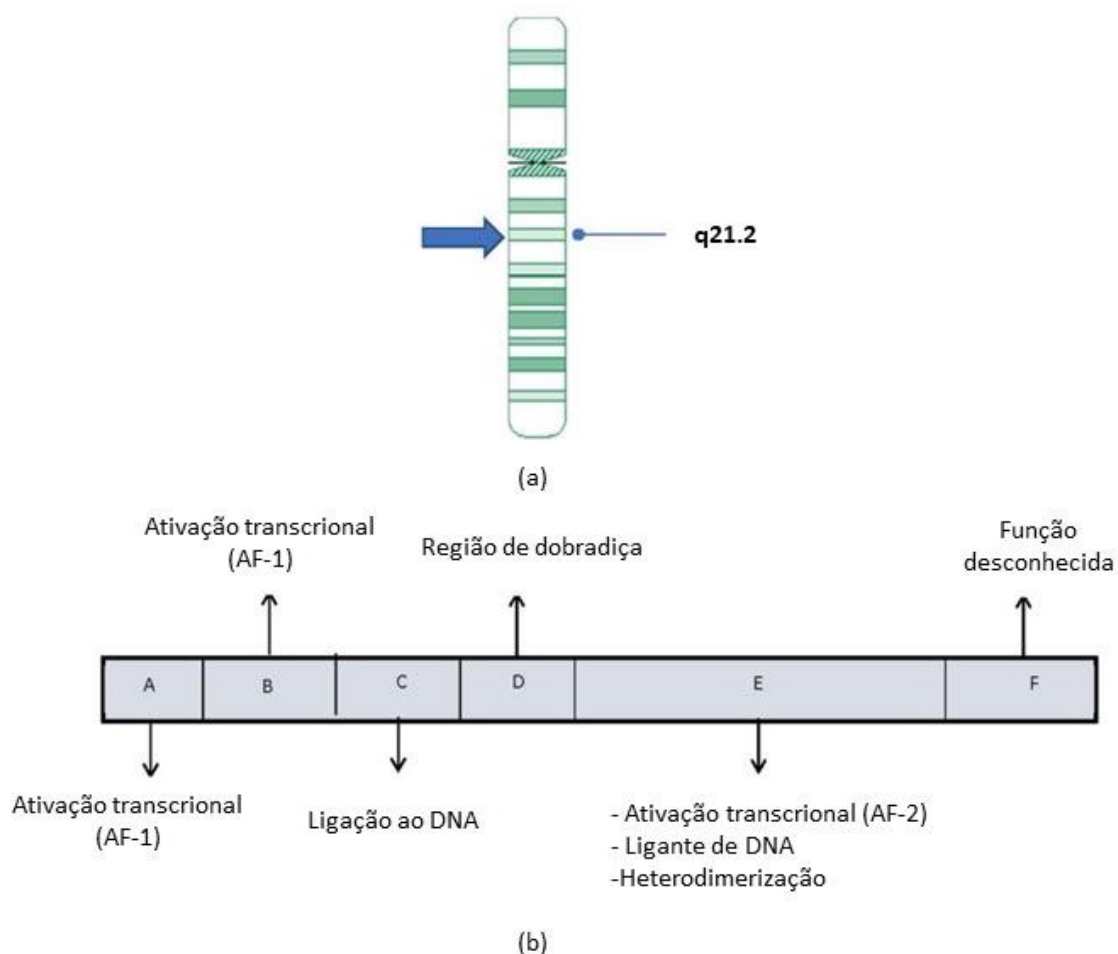
transcrição, uma vez ligado ao ácido retinóico, migra para o núcleo e ativa a transcrição de genes que estão relacionados à diferenciação celular no componente hematopoético (Figura 2) (Abdul *et al.*, 2020).

Figura 1 – (a) Localização precisa do *PML* em 15q24.1. (b) Representação esquemática mostrando os domínios do gene *PML* e as funções de cada um.



Fonte: Adaptado de Abdul e colaboradores (2020).

Figura 2 – (a) Localização precisa do *RARα* 17q21.2 (b) Representação esquemática mostrando os seis domínios do gene *RARα* e as funções de cada um.

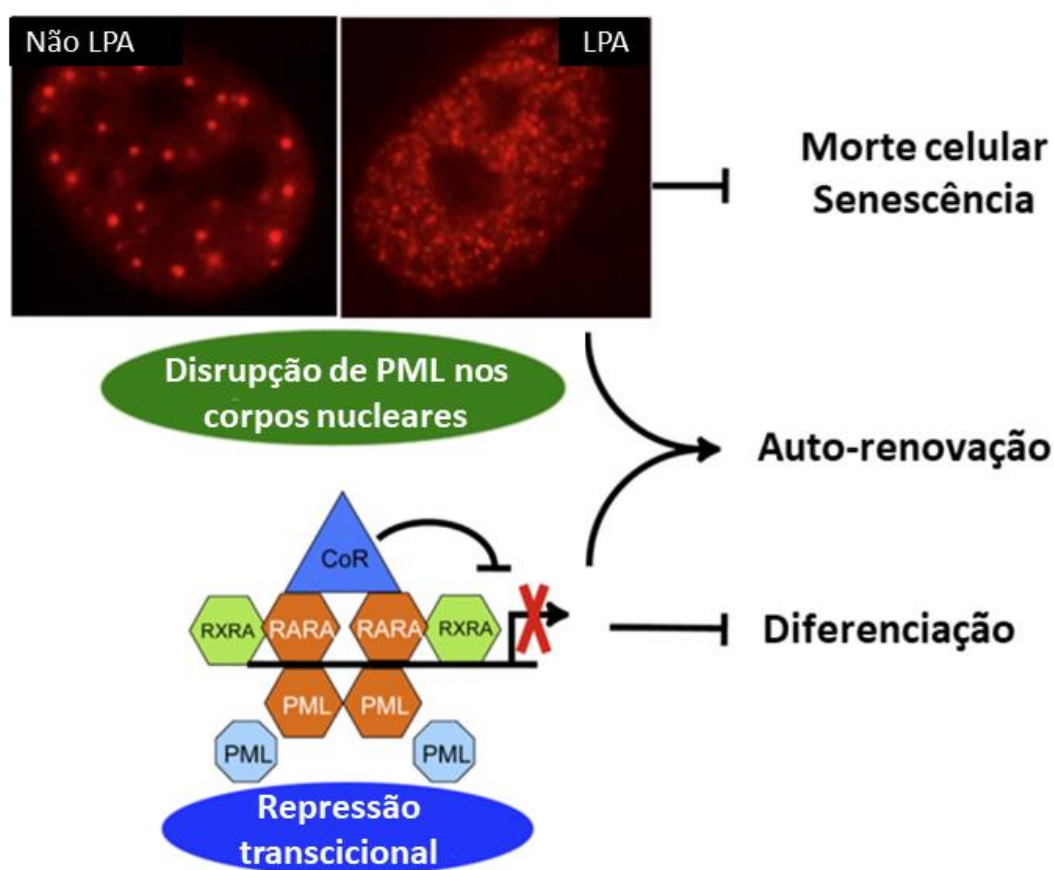


Fonte: Adaptado de Abdul e colaboradores (2020).

No caso da LPA, os níveis de proteína PML encontram-se comprometidos devido ao fato de pelo menos um alelo do gene estar envolvido na *t(15;17)/PML-RARα*. Além disso, a oncoproteína *PML-RARα* mantém sua capacidade de ligação à proteína PML parental e interfere de forma dominante negativa na sua função. A heterodimerização entre PML e *PML-RARα* resulta em um padrão anormal de localização da proteína PML, que deixa os *nuclear bodies* e passa a ter uma distribuição microparticulada pelo núcleo. Este deslocamento sugere que a proteína *PML-RARα* possa exercer uma interferência na função fisiológica da PML (Guo et al., 2000). É interessante ressaltar que a proteína PML se colocaliza com a proteína

supressora de tumor TP53 nos *nuclear bodies*, atuando como co-ativadora desta e desenvolvendo um papel de controlador da senescência celular dependente de TP53 (Perez et al., 1996). Por outro lado, PML/RAR α também afeta a transcrição de genes dependentes das regiões responsivas ao ácido retinóico e de genes que não possuem essas regiões. O resultado final é uma mutação negativa dominante, bloqueando a diferenciação e impedindo a apoptose simultaneamente, o que permite a proliferação dos progenitores leucêmicos (Figura 3) (Pandolfi et al., 2017; Jimenez et al., 2020).

Figura 3 – Representação esquemática da patogênese da LPA promovida por PML/RAR α .



Fonte: Adaptado de Pandolfi e colaboradores (2017).

Além do PML-RAR α , existem 16 rearranjos envolvendo RAR α com parceiros de fusão alternativos. O PLZF (do inglês, *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*), também conhecido como ZBTB16, é um repressor transcricional envolvido no controle

do ciclo celular e na diferenciação de células mieloides. *PLZF* está localizado no cromossomo 11q23 e gera rearranjos *PLZF-RARα* t(11;17)(q23;q21), que representam cerca de 1% das LPAs e são mais resistentes à terapia. A segunda variante mais comum é com a *NPM1* (do inglês, *Nucleophosmin*), uma fosfoproteína nucleolar presente no locus 5q32 que está envolvida em acompanhamento molecular, síntese de ribossomos, reparo de DNA e estabilidade do genoma. Ao contrário da LPA com *PLZF-RARα*, a LPA com *NPM1-RARα* parece ser relativamente sensível ao tratamento (Iyer *et al.*, 2023).

Anormalidades citogenéticas adicionais podem ser encontradas em um terço dos pacientes com LPA, sendo a trissomia do cromossomo 8 a mais comum. Com o auxílio de tecnologias de sequenciamento de nova geração, estudos exploraram o papel das mutações genéticas na LPA e verificaram que mutações em *FLT3* eram mais frequentes, presentes em aproximadamente um terço dos pacientes (Mannan *et al.*, 2020). Essas mutações ativadoras em *FLT3* que podem ocorrer como duplicação em tandem (*ITD*) ou mutações no domínio da tirosina quinase (*TKD*) foram associadas ao aumento da carga tumoral e ao risco de recaída, e são consideradas como um marcador de prognóstico negativo na LPA, apesar de estudos controversos (Lucena-Araujo *et al.*, 2014; Daver *et al.*, 2019; Iyer *et al.*, 2022; Balafail *et al.*, 2023). Outros genes observados com mutação recorrente na LPA incluíram *WT1* (14%), *NRAS* (10%) e *KRAS* (4%) (Madan *et al.*, 2016; Mannan *et al.*, 2020).

Existem três regiões distintas de agrupamento de pontos de quebra (do inglês, *breakpoints*) de *PML*, nomeadamente BCR1, BCR2 e BCR3, que originam um gene de fusão *PML/RARα* de tamanhos variados. O transcrito BCR1 resulta de uma quebra no intrón 6 de *PML* com o exón 3 do *RARα*; uma quebra no éxon 6 de *PML* com o éxon 3 de *RARα* deriva o transcrito BCR2; o transcrito BCR3 se dá por uma quebra

no íntron 3 de *PML* com o éxon 3 do *RAR α* . A frequência dos diferentes pontos de quebra depende principalmente da etnia e da localização geográfica. O ponto de quebra BCR1 é mais frequente entre indivíduos de origem latina (Santana *et al.*, 2024). Enquanto a forma mais curta (BCR3) é menos frequente na LPA (aproximadamente 30% dos casos), e está associada a uma pior resposta ao tratamento, com alguns estudos relacionando esse *breakpoint* com mutações em *FLT3* (Balafail *et al.*, 2023).

2.2.1 Manifestações clínicas

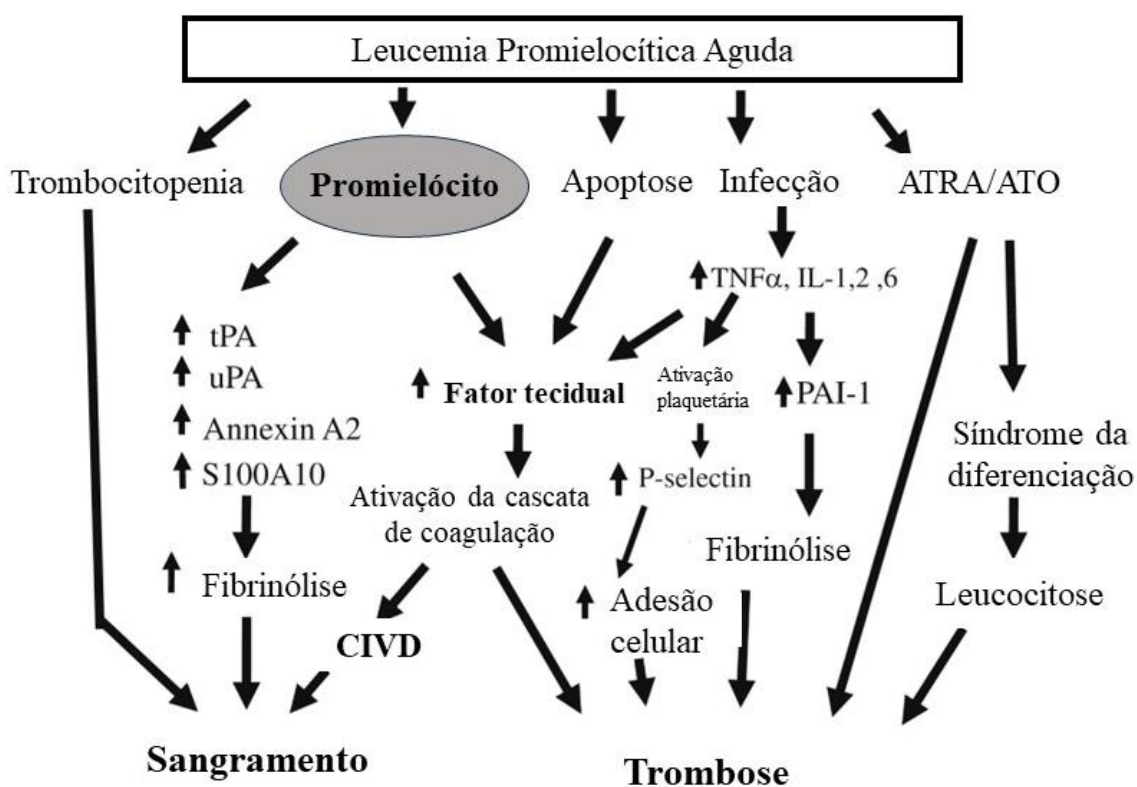
As manifestações clínicas dos pacientes com LPA podem se assemelhar as de outros subtipos de LMA apresentando febre, astenia, hiporexia e perda ponderal. Organomegalia, adenomegalia e infiltração leucêmica da pele ou sistema nervoso central são incomuns ao diagnóstico (Jácomo *et al.*, 2008). A infiltração de promielócitos na medula óssea promove anormalidades na contagem das células normais, com anemia e trombocitopenia. Ao diagnóstico, a maioria dos casos apresenta leucopenia, enquanto a leucocitose é mais rara (dessa forma, episódios de leucostase são incomuns) (Jácomo *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2018).

Desde os primeiros relatos da LPA, os pacientes apresentam eventos hemorrágicos que ocorrem em aproximadamente 60% dos casos, na presença de uma coagulopatia grave semelhante à coagulação intravascular disseminada (CIVD). Das complicações hemorrágicas, 65 a 80% são hemorragias intracranianas, geralmente fatais, seguidas de sangramento gastrointestinal e hemorragia intra-alveolar pulmonar (Jácomo *et al.*, 2008; Kwaan *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2018).

A alteração do equilíbrio hemostático na LPA é causada por múltiplos fatores complexos, incluindo vários graus de trombocitopenia, aumento nas atividades pró-coagulantes dos promielócitos leucêmicos e alterações do sistema fibrinolítico (Kwaan

et al., 2014). Os promielócitos anômalos produzem quantidades excessivas de fator tecidual, citocinas (IL-1 β , TNF α) e pró-coagulantes do câncer, levando à geração de grandes quantidades de trombina e à coagulopatia de consumo. Além disso, as células leucêmicas da LPA expressam altos níveis de Anexina II, um receptor e ativador de tPA/uPA, que resulta em uma produção descontrolada de plasmina e hiperfibrinólise (Figura 4) (Hambley *et al.*, 2021).

Figura 4 – Disfunção hemostática na leucemia promielocítica aguda



*CIVD, coagulação intravascular disseminada; IL, interleucina; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio 1; TNF, fator de necrose tumoral; tPA, ativador do plasminogênio tecidual; uPA, ativador do plasminogênio uroquinase.

Fonte: Adaptado de Kwaan e colaboradores (2014).

Os fatores de risco para complicações hemorrágicas incluem a alta contagem de leucócitos ($>10 \times 10^9/L$), número de promielócitos elevados em sangue periférico ($>30 \times 10^9/L$), idade superior a 60 anos, função renal prejudicada e aumento da

fibrinólise refletida pela hipofibrinogenemia (<100 mg/dl) e trombocitopenia grave (Kwaan *et al.*, 2014).

As complicações relacionadas à trombose são menos frequentes do que os sangramentos na LPA. Em comparação com outras leucemias agudas, os níveis de pró-coagulante do câncer são mais elevados na LPA, levando à ativação do fator X e ao aumento da propensão à trombose (Falanga *et al.*, 1998; Dubois *et al.*, 1994; Hambley *et al.*, 2021). Foram identificadas características moleculares e imunofenotípicas mais prevalentes em pacientes com LPA que desenvolvem trombozes. Estes incluíram a expressão de CD2, CD5, *FLT3-ITD* e a isoforma BCR3. Além disso, a variante hipogranular foi associada à trombose da veia porta (Breer *et al.*, 2012; Kwaan *et al.*, 2014).

O monitoramento da contagem de plaquetas e parâmetros de coagulação de rotina, incluindo tempo de protrombina, tempo parcial de tromboplastina ativado e tempo de trombina, bem como os níveis de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrinogênio-fibrina devem ser monitorados para tratar a coagulopatia. Sob suspeita de diagnóstico, transfusões de fibrinogênio e/ou crioprecipitado, plaquetas e plasma fresco devem ser administrados diariamente ou mais de uma vez por dia, se necessário, para manter a concentração de fibrinogênio em 100-150mg/dL, uma contagem de plaquetas entre $30 \times 10^9/L$ a $50 \times 10^9/L$ e a razão normalizada internacional (INR) abaixo de 1,5. Esse tratamento de suporte deve ser continuado durante a terapia de indução e procedimentos invasivos devem ser evitados até que a coagulopatia seja controlada (Sanz *et al.*, 2019).

2.2.2 Diagnóstico

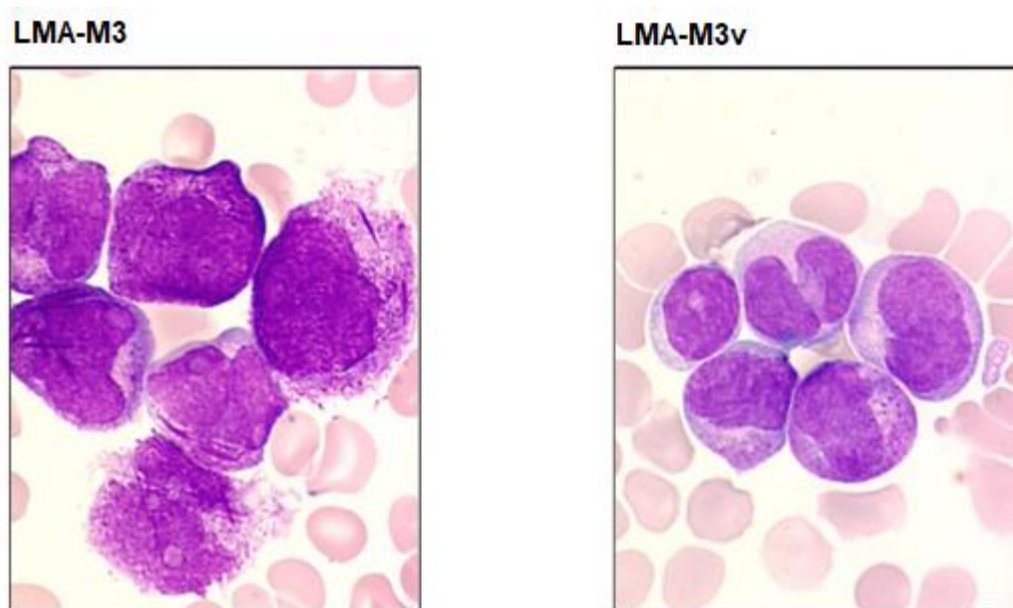
A maioria das mortes precoces na LPA são consideradas evitáveis. Consequentemente, o reconhecimento precoce da doença é essencial pois atrasos

significativos no diagnóstico aumentam a probabilidade de mortalidade precoce (Odetola *et al.*, 2023). Portanto, os indivíduos com suspeita da doença devem ser imediatamente hospitalizados e gerenciados como uma emergência médica. O diagnóstico deve ser confirmado a nível genético por laboratórios de referência experientes. No entanto, mesmo antes dessa confirmação, o uso do agente diferenciador ATRA (ácido *all* trans-retinoico) e as medidas para combater a coagulopatia devem ser rapidamente iniciadas. Caso o diagnóstico não seja confirmado por exames genéticos ou moleculares, o ATRA deve ser interrompido (Sanz *et al.*, 2019).

A partir da suspeita clínica da LPA, a investigação laboratorial se inicia com a avaliação do risco hemorrágico pela contagem de plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, D-dímero e fibrinogênio (Cingam & Koshy, 2023). O hemograma, como exame de base, detecta as primeiras alterações como a pancitopenia, e quando há leucocitose, esta costuma ser discreta (Jácomo *et al.*, 2008). No estirado sanguíneo observamos a presença de promielócitos anômalos, assim como no mielograma, onde essas células se coram fortemente à reação da mieloperoxidase e ao Sudan Black. Na LPA, dois subtipos morfológicos podem ocorrer: o padrão hipergranular (ou subtipo FAB LMA-M3 clássico) e o microgranular (subtipo FAB LMA-M3 variante ou hipogranular), que corresponde a 25% dos casos. Na forma clássica são observados promielócitos anômalos com granulação azurofílica abundante, núcleo irregular e bastonetes de Auer, organizados em feixes, caracterizando as chamadas células de Faggot. Enquanto na variante hipogranular, geralmente associada à leucocitose, os blastos com núcleos bilobulados ou reniformes e discreta granulação citoplasmática são encontrados em maior quantidade. Em menor número, blastos hipergranulares típicos podem aparecer. Há

ainda uma forma mais rara, hiperbasofílica, que se caracteriza por células leucêmicas com uma alta relação núcleo/citoplasmática e um citoplasma fortemente basofílico contendo ou não, granulações mais esparsas (Figura 5) (Jácomo *et al.*, 2008). A caracterização imunofenotípica dos blastos é marcada pela expressão de MPO citoplasmático, CD13, CD33 e CD117 e ausência de marcadores de precursores, como CD34 e HLA-DR. A expressão de CD34 está presente em cerca de 20-30% das LPAs, e está associada à expressão de CD2 e isoforma BCR3. Outros marcadores são expressos em menor frequência (Vieira *et al.*, 2023).

Figura 5 – Tipos morfológicos de LPA.



Fonte: Adaptado de Xavier (2019).

A confirmação diagnóstica da LPA deve ser feita preferencialmente utilizando amostras de medula óssea para a pesquisa da $t(15;17)$ ou do gene híbrido *PML-RAR α* . As técnicas mais utilizadas são as de cariotipagem convencional, hibridação *in situ* fluorescente (FISH), reação em cadeia de polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR) ou PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR) (Sanz *et al.*, 2019). Outra opção é a imunofluorescência com anticorpos anti-PML. Este anticorpo se liga à

proteína PML que se localiza nos corpos nucleares. Nos pacientes portadores do rearranjo *PML-RAR α* , a PML encontra-se redistribuída e observa-se, à microscopia, um padrão microparticulado (Jácomo *et al.*, 2008). No entanto, a coloração nuclear de PML depende de interpretação subjetiva e, a menos que seja realizada por examinadores experientes, parece menos reproduzível do que as outras metodologias empregadas. Quando comparados com as outras ferramentas de diagnóstico, FISH e imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti-PML são mais rápidos, altamente sensíveis e específicos (Sanz *et al.*, 2009). Contudo, esses métodos não podem substituir a RT-PCR ou RQ-PCR, que sempre deve ser executada em paralelo, como a única técnica que permite definir o tipo de isoforma *PML/RAR α* e sua quantificação para monitoramento de doença residual mínima (Sanz *et al.*, 2019).

2.2.3 Classificação de risco

Para a determinação do risco de recaída na LPA, o grupo europeu PETHEMA-GIMEMA utilizou como critérios as contagens iniciais de leucócitos e plaquetas em sangue periférico de 217 pacientes. Utilizando uma análise de regressão multivariável, os pacientes foram organizados em três grupos de risco. O grupo de Baixo risco foi definido por uma contagem de leucócitos menor ou igual a $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ com plaquetas acima de $40 \times 10^3/\mu\text{l}$. Para o grupo de risco Intermediário, a contagem de leucócitos foi estabelecida como menor ou igual a $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ e uma contagem de plaquetas menor ou igual a $40 \times 10^3/\mu\text{l}$. Por último, a categoria de Alto risco era definida por uma contagem de leucócitos acima de $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Quadro 3) (Sanz *et al.*, 2000).

Quadro 3 – Estratificação de risco de recaída na LPA segundo os critérios do grupo PETHEMA-GIMEMA.

Grupo de risco	WBC e PLT ao diagnóstico
----------------	--------------------------

Baixo risco	$WBC \leq 10 \times 10^3/\mu l$ e $PLT > 40 \times 10^3/\mu l$
Risco intermediário	$WBC \leq 10 \times 10^3/\mu l$ e $PLT \leq 40 \times 10^3/\mu l$
Alto risco	$WBC > 10 \times 10^3/\mu l$

*WBC: do inglês, *White Blood Cell* (células brancas do sangue); PLT: Plaquetas.

Fonte: Sanz e colaboradores (2000).

No entanto, os critérios foram reavaliados e atualmente o risco de recaída no paciente com LPA é categorizado pela contagem global de leucócitos ao diagnóstico, sendo estabelecido como Baixo risco (contagem de leucócitos menor ou igual a $10 \times 10^3/\mu l$) e Alto risco (contagem de leucócitos acima de $10 \times 10^3/\mu l$). Essa definição também é importante para a escolha terapêutica na LPA (Quadro 4) (Sanz *et al.*, 2019).

Quadro 4 – Estratificação de risco de recaída na LPA e tratamento de primeira linha.

Grupo de risco	WBC ao diagnóstico	Tratamento
Baixo risco	$WBC \leq 10 \times 10^3/\mu l$	Primeira opção: ATRA + ATO sem quimioterapia Segunda opção: ATRA + quimioterapia
Alto risco	$WBC > 10 \times 10^3/\mu l$	Primeira opção: ATRA + ATO com quimioterapia Segunda opção: ATRA + quimioterapia

*ATRA: Ácido *all-trans*retinoico; ATO: Trióxido de arsênio; WBC: do inglês, *White Blood Cell* (células brancas do sangue).

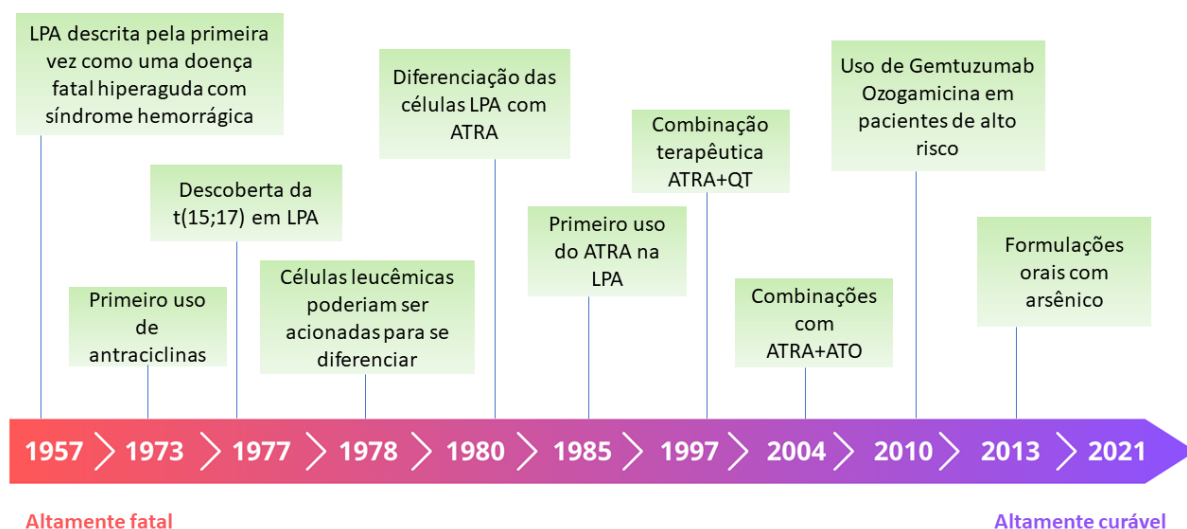
Fonte: Sanz e colaboradores (2019).

2.2.4 Tratamento

Descrita pela primeira vez em 1957 pelo médico norueguês LK Hillestad, a LPA foi caracterizada como uma doença rapidamente fatal em virtude dos episódios hemorrágicos graves observados nos pacientes, que apresentavam sobrevida inferior

a um mês (Hillestad, 1957; Liang *et al.*, 2021). Nas últimas quatro décadas, esse cenário mudou substancialmente graças aos avanços constantes na elucidação das bases moleculares e no desenvolvimento de terapias-alvo, tornando a LPA (considerada como o subtipo mais mortal) numa das leucemias mais curáveis atualmente (Figura 6) (Yilmaz *et al.*, 2021).

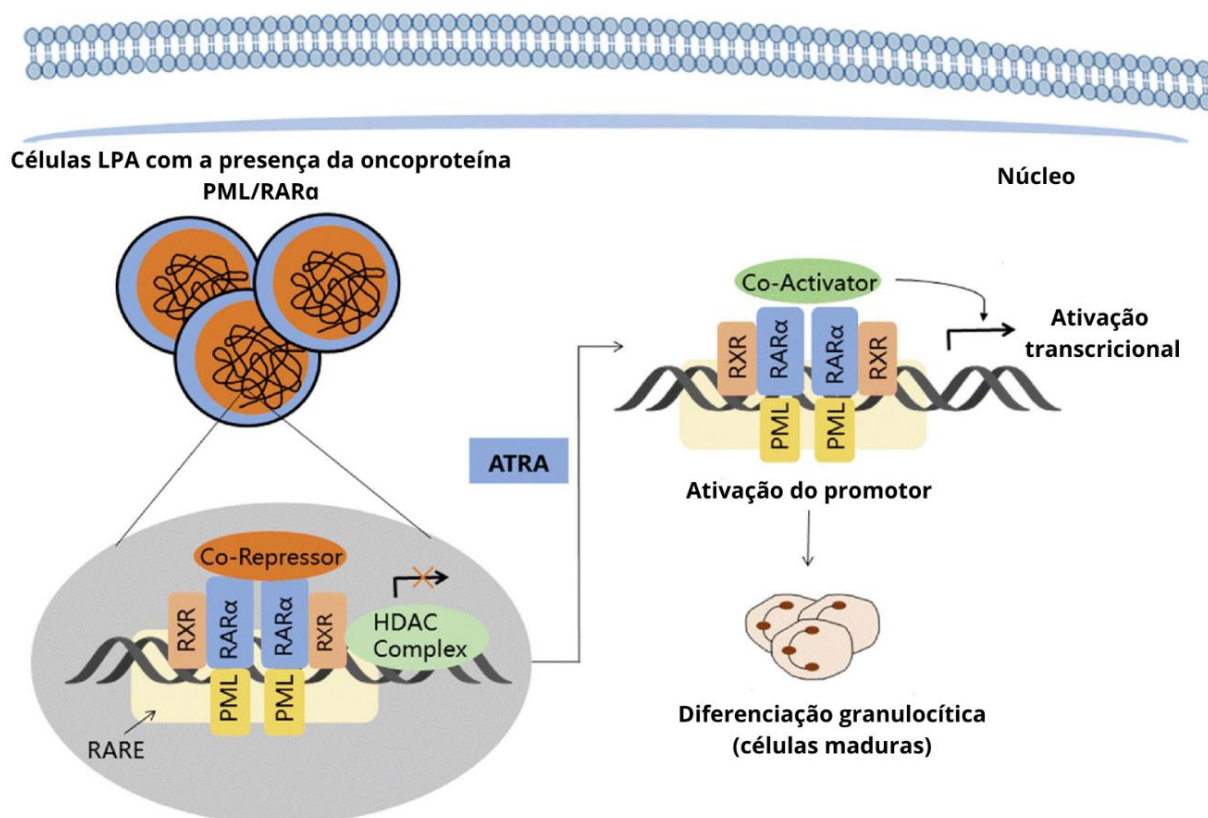
Figura 6 – Evolução da terapia na LPA.



Fonte: Adaptado de Yilmaz (2021).

Devido ao seu baixo custo e uso conveniente, o ATRA é reconhecido como o medicamento de escolha para terapia de indução na LPA (Liang *et al.*, 2021). O ATRA é um importante metabólito da vitamina A que ocasiona uma mudança conformacional dos transcritos *PML-RAR α* , levando à liberação dos correpressores, recrutamento de histonas acetiltransferases e alívio da repressão transcricional. Esses fatores levam à diferenciação mieloide terminal e apoptose das células leucêmicas tratadas (Figura 7) (Yilmaz *et al.*, 2021).

Figura 7 – ATRA participa da ativação transcricional de genes relacionados à diferenciação.



Como membro da família de receptores de esteroides/vitamina D/hormônio tireoidiano, os receptores nucleares de retinol atuam como fatores de transcrição dependentes de ligantes e transmitem ATRA. Dois tipos de receptores nucleares de retinol foram encontrados: RARs e RXRs que consistem em um domínio de transativação amino-terminal e dois domínios altamente conservados, um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ligação C-terminal. Os RXRs e os RARs exercem a sua ação ligando-se como homodímeros ou heterodímeros a sequências específicas nos promotores dos genes alvo, regulando a sua transcrição e mediando os efeitos biológicos dos retinóides através do seu envolvimento na ativação do gene mediada pelo ácido retinóico. Antes da ligação a um ligante, o RXR e o RAR α se ligam a regiões específicas do DNA chamadas elementos de resposta ao ácido retinóico (RAREs) na forma de heterodímeros. RXR e RAR α então recrutam os corepressores que silenciam mediadores do ácido retinóico e do receptor do hormônio tireoidiano (SMRT)/corepressor do receptor nuclear (NCoR1) associados às histonas desacetilases, o que leva à repressão transcricional dos genes-alvo. O receptor do heterodímero atua no núcleo como parte de um complexo formado com histona desacetilase (HDAC) e outros co-inibidores, que restringem o DNA alvo a uma conformação enrolada para evitar sua exposição a transativadores. Nas células leucêmicas de LPA, o PML-RAR α interrompe a sinalização do ATRA de maneira dominante negativa, aumentando a ligação de complexos repressores transcacionais. Devido à sensibilidade dessas células ao ATRA, após o tratamento com ATRA, o complexo NCoR-HDAC pode ser separado do RAR e, a direcionar os fatores de transcrição oncogênicos e seus efeitos anormais e os promielócitos anômalos podem sofrer transcrição e diferenciação para formar os granulócitos maduros. O ATRA induz a diferenciação terminal de promielócitos leucêmicos, e essas células malignas diferenciadas subsequentemente sofrem apoptose espontânea por conta própria.

Fonte: Adaptado de Liang e colaboradores (2021).

Em meados da década de 1980 o ATRA foi usado em pacientes com LPA, resultando em altas taxas de resposta (>90%) que superavam os resultados abaixo do ideal promovidos pela monoterapia com antraciclina (55-88%) (Bernard *et al.*, 1973; Fenaux *et al.*, 1991; Daenen *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 1988; Yilmaz *et al.*, 2021).

Entretanto, o ATRA isoladamente promovia uma resposta geralmente curta, com duração de 3–6 meses. Alternativamente, através da integração do ATRA à quimioterapia no final dos anos 90, os estudos clínicos mostraram uma eficiência muito maior no tratamento, em que a taxa de remissão completa (RC) aumentou para 90-95% e a sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos para 74% (Wang & Chen, 2008; Yilmaz *et al.*, 2021).

Os esforços para as melhorias do tratamento da LPA prosseguiram com a incorporação do trióxido de arsênio (ATO) nos anos 2000. Embora seu mecanismo de ação não seja totalmente compreendido, o ATO possui efeitos duplos dependentes da dose nas células LPA, induzindo preferencialmente apoptose (em altas concentrações) e diferenciação (em baixas concentrações). Esses papéis estão relacionados à sua função na degradação da proteína de fusão PML-RAR α e da proteína PML normal, onde o ATO interage com grupos tiois *in vitro* em células NB4 (Vitaliano-Prunier *et al.*, 2014; Yilmaz *et al.*, 2021). Desse modo, revolucionando o panorama das neoplasias hematológicas, o emprego da combinação ATO+ATRA e seu efeito sinérgico na degradação do seu alvo, a oncoproteína PML/RAR α , resultou em desfechos tão eficazes quanto aos dos tratamentos baseados em quimioterapia citotóxica (Liang *et al.*, 2021).

Nessa conjuntura, estudos de não-inferioridade foram realizados para a avaliação do tratamento da LPA. Centros de pesquisas de países desenvolvidos investigaram se a abordagem terapêutica com ATRA+ATO seria superior ao protocolo padrão composto por ATRA e quimioterapia (Lo-coco *et al.*, 2013; Burnett *et al.*, 2015).

O APL0406, projetado pelo grupo italiano Malattie Ematologiche Dell'Adulto (GIMEMA), foi um estudo prospectivo, randomizado e multicêntrico de fase III, que comparou os protocolos terapêuticos em pacientes categorizados como baixo ou risco

intermediário na LPA. O acompanhamento médio foi de 34,4 meses. As taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em dois anos foi de 97%, SLD a longo prazo de 99,1% e a incidência cumulativa de recaída (ICR) de 1.1% no grupo de ATRA+ATO. Enquanto no grupo ATRA+quimioterapia, a SLD em dois anos foi de 86%, SLD a longo prazo de 94,4% e ICR: 9,4%. Além de melhores desfechos, o tratamento combinado com ATRA+ATO apresentou maior segurança, incluindo menores complicações relacionadas à mielossupressão e infecções. Por outro lado, foi associado a efeitos colaterais frequentes, mas gerenciáveis (isto é, leucocitose, aumento de enzimas hepáticas e prolongamento do QTC) (Lo-coco *et al.*, 2013).

Conduzido no Reino Unido pelo *National Cancer Research Institute* (NCRI), o AML17 avaliou os dois tipos de tratamento independentemente do grupo de risco. Dos 235 pacientes inseridos, 57 pacientes foram categorizados como alto risco para doença. Os resultados mostravam que os pacientes que utilizavam ATRA+ATO tinham maiores taxas de SLD e menor incidência cumulativa de recaída (ICR). Quanto à sobrevida global, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois braços (Burnett *et al.*, 2015).

Os resultados observados nestes dois grandes ensaios levaram à aprovação do ATO para o tratamento de pacientes recém-diagnosticados com LPA de baixo/risco intermediário (definidos como $WBC \leq 10 \times 10^9/L$) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Sendo assim, o tratamento de primeira linha da LPA preconiza para o grupo de pacientes de alto risco (àqueles com contagem de leucócitos ao diagnóstico acima de $10 \times 10^9/L$) duas abordagens, que incluem: ATRA e ATO mais quimioterapia ou, na indisponibilidade do ATO, ATRA mais quimioterapia. Os regimes mais comuns à base de quimioterapia abrangem as antraciclinas idarrubicina ou daunorrubicina isoladamente, ou em

associação com citarabina. Quanto ao grupo de baixo/risco intermediário, os pacientes podem receber uma terapia livre de quimioterapia, apenas com a combinação do ATO+ATRA (Sanz *et al.*, 2019).

No entanto, alguns pacientes sofrerão com a síndrome de diferenciação (também conhecida como síndrome do ácido retinóico) que ocorre dentro de uma a duas semanas após o início do ATRA e/ou ATO. A incidência relatada varia de 2% a 48% (Vahdat *et al.*, 1994; Wiley & Firkin, 1995; De Botton *et al.*, 1998; Tallman *et al.*, 2000; Montesinos *et al.*, 2009; Stahl *et al.*, 2019). Esta ampla variação na incidência é explicada pela aplicação de diferentes critérios diagnósticos, bem como pelo uso de variados regimes de terapia de indução e estratégias profiláticas no tratamento da LPA (Stahl *et al.*, 2019). As manifestações clínicas associadas a este efeito colateral incluem dispneia, infiltrados pulmonares, febre inexplicável, derrame pleuropericárdico, hipotensão, insuficiência renal aguda e edema periférico (Jimenez *et al.*, 2020). O diagnóstico precoce permanece um desafio, pois os sinais e sintomas são inespecíficos e podem ser confundidos com outras condições médicas concomitantes (Jiang *et al.*, 2023). Nos pacientes que apresentam a síndrome do ATRA, são observadas taxas significativamente menores de sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) em comparação com pacientes que não desenvolvem essa complicação do tratamento (Jimenez *et al.*, 2020). Foi proposto que a patogênese da síndrome de diferenciação é semelhante à da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Portanto, à medida que o ATRA leva os promielócitos anômalos à maturação, são liberadas citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas IL-1, IL- β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral α , que podem causar febre, taquipneia e taquicardia, levando ao choque cardiopulmonar, se não tratada. Além disso, a liberação de catepsina G causa lesão endotelial e aumenta a permeabilidade vascular,

induzindo a síndrome de vazamento capilar que pode levar à hipoperfusão tecidual e danos aos órgãos-alvo. A terapia de indução também pode aumentar a quimiotaxia de promielócitos e blastos à medida que essas células se diferenciam em neutrófilos, levando ao aumento da adesão de blastos e leucocitose, causando ainda mais danos endoteliais e levando à falência de órgãos (Jiang *et al.*, 2023). O diagnóstico dessa síndrome em tempo hábil é essencial para reduzir a mortalidade durante a indução de LPA, especialmente em pacientes de alto risco. Portanto, recomenda-se o tratamento imediato com esteroides à primeira suspeita clínica, e a suspensão do ATRA/ATO em casos graves, ou se não houver resposta ao tratamento (Stahl *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2023).

Além disso, as variantes de fusão envolvendo o $RAR\alpha$ apresentam diferentes sensibilidades ao ATRA e ao ATO, excluindo $PML-RAR\alpha$ (Quadro 5). O manejo apropriado desses pacientes ainda é desconhecido porque, com exceção do rearranjo $ZBTB16/RAR\alpha$, as evidências consistem principalmente em relatos de casos únicos. Desse modo, assume-se como regra geral que o tratamento de pacientes com variantes sensíveis ao ATRA devem incluir esse agente combinado com quimioterapia à base de antraciclina. Enquanto naqueles com variantes resistentes ao ATRA, o gerenciamento consiste em abordagens semelhantes às da LMA (Sanz *et al.*, 2019).

Quadro 5 – Sensibilidade ao ATRA e ATO dos genes de fusão envolvendo $RAR\alpha$, excluindo $PML-RAR\alpha$.

Rearranjo com $RAR\alpha$	Translocações	Sensibilidade ao ATRA	Sensibilidade ao ATO	Primeiro relato
$ZBTB16-RAR\alpha$	$t(11;17)(q23;q21)$	Pouco responsivo	Pouco responsivo	Chen <i>et al.</i> , 1993
$NPM-RAR\alpha$	$t(5;17)(q35;q21)$	Sensível	ND	(Corey <i>et al.</i> , 1994)

NuMA-RAR α	t(11;17)(q13;q21)	Sensível	ND	(Wells <i>et al.</i> , 1997)
STAT5b-RAR α	der(17)	Pouco responsivo	Pouco responsivo	(Arnould <i>et al.</i> , 1999)
PRKAR1A-RAR α	t(17;17)(q21;q24) ou del(17)(q21;q24)	Sensível	Sensível	(Catalano <i>et al.</i> , 2007)
FIP1L1-RAR α	t(4;17)(q12;q21)	Sensível em 1 caso	ND	(Kondo <i>et al.</i> , 2008)
BCoR-RAR α	t(X;17)(p11;q21)	Sensível em 2 casos	Insensível em 1 caso	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2010)
OBFC2A-RAR α	t(2;17)(q32;q21)	Sensível <i>in vitro</i> . Sensível em 1 dos 2 casos.	ND	(Won <i>et al.</i> , 2013)
TBLR1-RAR α	t(3;17)(q26;q21)	Insensível	ND	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
GTF2I-RAR α	t(7;17)(q11;q21)	Sensível	Sensível	(Li <i>et al.</i> , 2015)
IRF2BP2-RAR α	t(1;17)(q42;q21)	Sensível	Sensível	(Yin <i>et al.</i> , 2015)
FNDC3B-RAR α	t(1;17)(q42;q21)	Sensível	Sensível	(Cheng <i>et al.</i> , 2017)

*ND: Não definida

Fonte: Adaptado de Sanz e colaboradores (2019).

2.2.5 Tratamento da LPA no Brasil

Apesar da aprovação do ATO pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil em 2013, os protocolos terapêuticos que utilizam o ATO não são amplamente empregados na prática clínica, em virtude da indisponibilidade do medicamento nos centros públicos de saúde. O ATO foi avaliado pela Comissão

Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento da LPA recidivada ou refratária, a qual decidiu por não o incorporar no SUS. As considerações apontavam que a evidência encontrada se resumia a estudos não randomizados, não comparativos e abertos, que apresentavam resultados pouco representativos. Além disso, o número de pacientes incluídos nos estudos era pequeno e a falta de um comparador inviabilizava a conclusão de que a tecnologia avaliada seria superior, inferior ou mesmo semelhante ao tratamento padrão (CONITEC, Brasil, 2014).

Em contrapartida, em abril de 2023, o ATO foi aprovado pela ANVISA para o tratamento de pacientes considerados de baixo ou risco intermediário na LPA. Contudo, para ter acesso ao medicamento, os pacientes precisam lidar com as dificuldades apresentadas pela judicialização do processo. Como consequência, o tratamento no Brasil continua sendo majoritariamente baseado na combinação do ATRA e quimioterápicos (Rego *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o Consórcio Internacional para Leucemia Promielocítica Aguda (*IC-APL*, do inglês *International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia*) foi uma iniciativa do Comitê de Membros Internacionais da Sociedade de Hematologia Americana (*IMC-ASH*) que teve como objetivo criar uma rede de instituições de países em desenvolvimento que trocariam experiências e dados, e receberiam apoio de grupos bem estabelecidos dos Estados Unidos e da Europa para um diagnóstico mais rápido, abordagens terapêuticas, e procedimentos de suporte adaptados às circunstâncias locais (Rego *et al.*, 2013).

Esse estudo formulou diretrizes de tratamento com base em protocolos de ensaios clínicos bem-sucedidos dos países desenvolvidos que utilizavam ATRA e quimioterapia para o tratamento da doença. O estabelecimento da rede *IC-APL*

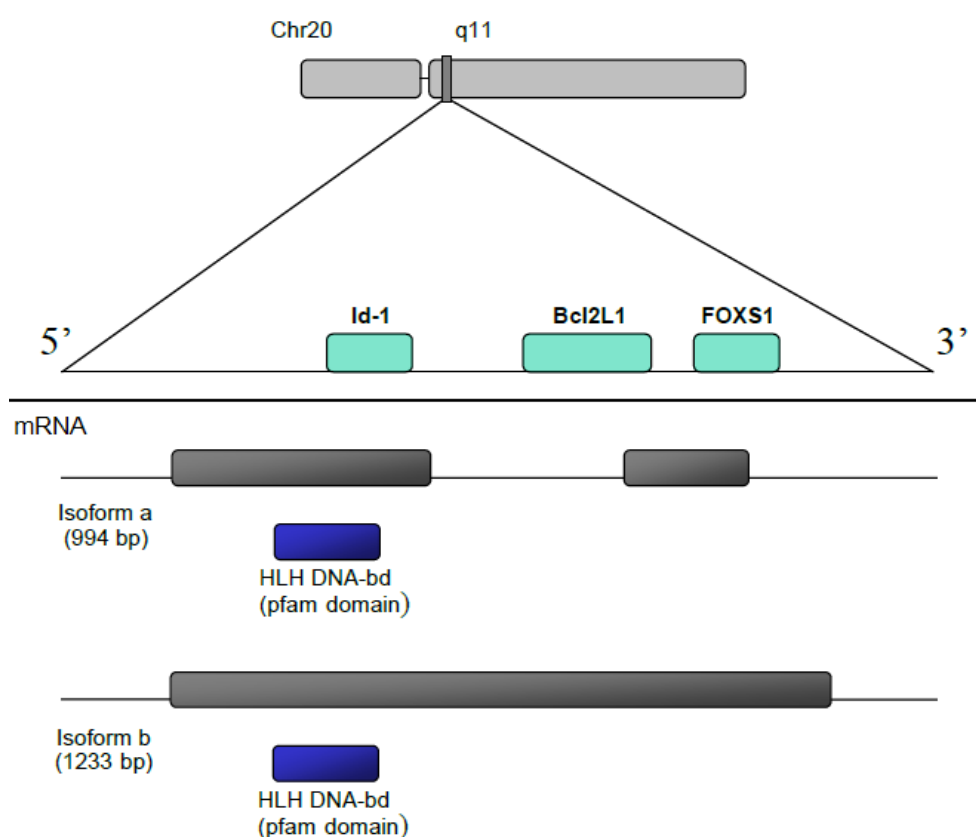
resultou em diminuição de quase 50% na mortalidade precoce e melhoria de quase 30% na SG, em comparação com os controles históricos (Jácomo *et al.*, 2007; Rego *et al.*, 2013). Apesar disso, 10-25% dos pacientes de alto risco tratados com ATRA+quimioterapia ainda recaem (De Botton *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2014; Jimenez *et al.*, 2020).

Dessa forma, os desafios mais importantes que permanecem na LPA incluem a morte precoce, que ocorre antes e durante a terapia de indução, e a otimização do tratamento em pacientes com doença de alto risco (Sanz *et al.*, 2019).

2.3 O GENE *ID1*

O gene *ID1* (*Inibidor de ligação ao DNA 1*) se localiza no braço longo do cromossomo 20 (*locus*: 20q11.21). O seu DNA contém 129 pb e possui duas variantes transcricionais, ID1A que contém 994 pbs e ID1B com 1233 pbs. ID1A é considerada a sequência canônica (Figura 8) (Castañón & Bazo, 2012).

Figura 8 – Composição genética de *ID1*.



Fonte: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (2012).

As proteínas inibidoras de ligação ao DNA (IDs) pertencem à família hélice-loop-hélice (HLH). As proteínas básicas de HLH (bHLH) se ligam a uma sequência de DNA conhecida como caixa E ou à caixa N relacionada, encontrada no promotor dos genes expressos (Tournay *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2020). A formação de heterodímeros é um procedimento essencial para a ligação ao DNA e ativação

transcricional. Os fatores de transcrição do bHLH são inibidos pelas proteínas IDs, que consistem em quatro subtipos: ID1, ID2, ID3 e ID4. As proteínas de identificação não possuem um domínio de ligação ao DNA e funcionam como antagonistas dominantes dos fatores transcricionais básicos do HLH através da heterodimerização com outros fatores de bHLH, como o MyoD1 e E1A, inibindo sua ligação ao DNA (Benezra *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 2020).

Dentre as proteínas do grupo das IDs, a mais amplamente estudada é a ID1 (Zhao *et al.*, 2020). Isolada pela primeira vez em 1990, é composta por 155 aa e o seu domínio principal localizado em 143-155aa é o responsável pela conformação *helix-loop-helix*. Seu principal motivo, codificado por 14 aa, é responsável pela sinalização de exportação nuclear. Altos níveis de ID1 são encontradas nas células do cérebro, fígado, pulmão, pele e glândula tireoidiana. Também é expresso em células fetais e na célula endotelial da veia umbilical (Benezra *et al.*, 1990; Castañón & Bazo, 2012).

A expressão aberrante de *ID1* já foi identificada em mais de 20 neoplasias humanas, dentre as quais podemos destacar o câncer de pulmão, glioblastoma, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de fígado e as leucemias (Figura 9). O papel do *ID1* no desenvolvimento do câncer é principalmente relacionado à sua função reguladora em vias de proliferação e diferenciação celular (Zhao *et al.*, 2020).

No âmbito das LMAs, a expressão aberrante de *ID1* foi previamente associada a um pior prognóstico (Tang *et al.* 2009; Damm *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2015; Lima *et al.*, 2023). A alta expressão de *ID1* é observada em aproximadamente 60% dos pacientes com LMA do subtipo M2 (FAB), o que inclui pacientes com t(8;21), que gera o gene e a proteína de fusão AML1-ETO. Wang e colaboradores observaram que motivos adicionais em ID1 localizados em sua região C-terminal interagem com o AKT1 que promove a fosforilação do AKT1, e promoção da leucemogênese em LMA

com t(8;21). Adicionalmente, um inibidor de ID1 prejudicou o crescimento *in vitro* das células leucêmicas e, quando combinado com um inibidor de AKT, desencadeou ainda mais a apoptose e inibição do crescimento, enquanto as células estaminais/progenitoras hematopoiéticas normais foram poupadas (Wang *et al.*, 2011).

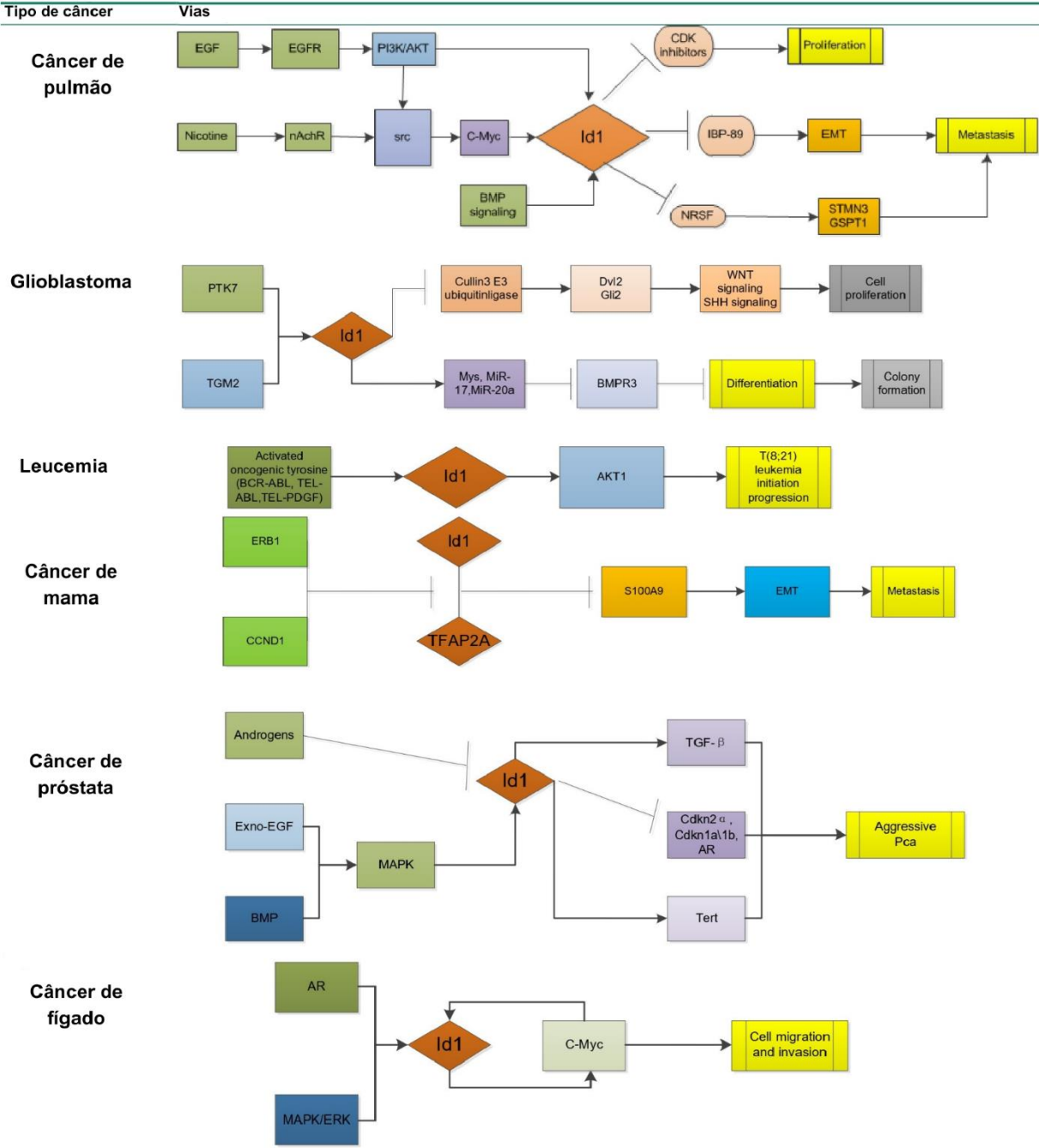
Foi demonstrado que o *ID1* atua como um regulador chave do comportamento das células-tronco hematopoéticas (CTHs), pois a ausência de *ID1* compromete a capacidade de autorrenovação das CTHs na medula óssea adulta e aumenta a tendência à diferenciação mieloide comparada a linhagem linfóide (Jankovic *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2007). Esse comprometimento está associado a alterações na expressão gênica, incluindo o aumento da expressão de p21, um alvo bem estabelecido de repressão mediada pelo *ID1* (Hong *et al.*, 2011). *ID1* e *ID3* atuam como reguladores negativos da transição de células-tronco pluripotentes humanas para um destino celular hematopoiético mais comprometido, em que a sua expressão pode ser importante para manter a imaturidade necessária para o crescimento das células leucêmicas, uma vez que *ID1* é frequentemente sobre-expresso em células de leucemia. No entanto, o significado funcional dessa relação não é conhecido (Alcaley *et al.*, 2003; Müller-Tidow *et al.*, 2004; Perl *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015).

Em relação à terapia direcionada a ID1 na leucemia, ao utilizar pimozide, um inibidor conhecido da USP1, foi verificada a sua eficiência na inibição do crescimento de células leucêmicas derivadas do paciente com LMA. USP1 é uma enzima deubiquitinante, que remove cadeias de poliubiquitina da proteína ID1. Muitos outros compostos exercem sua função antitumoral através de vias de sinalização relacionadas a ID1 ou são encontrados possuindo regulação eficaz em ID1 (Williams *et al.*, 2011; Mistry *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2020).

Já está bem estabelecido na literatura que os níveis de expressão de *ID1* estão aumentados no microambiente da medula óssea, com implicações diretas no desenvolvimento da hematopoese normal e aumento da leucemogênese (Prabhu *et al.*, 1997; Valdimarsdottir *et al.*, 2002; Ruzinova *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2023). No entanto, os efeitos de *ID1* no microambiente da LMA ainda permanecem pouco explorado. Recentemente, Fei e colaboradores observaram que a perda de *ID1* no microambiente medular resultava em progressão prejudicada da LMA em modelos murinos. Além disso, o *ID1* foi altamente expresso no microambiente medular de pacientes com LMA, especialmente em células-tronco mesenquimais. Nos camundongos com LMA nocauteados para *ID1*, os níveis da proteína ANGPTL7 no microambiente foram significativamente menores, e a sobrevida foi significativamente maior, sugerindo que os níveis da proteína SP1 mediados por *ID1*, podem ser essenciais para a transcrição de *ANGPTL7* na progressão da LMA. Essas descobertas sugerem uma função celular não-autônoma para o *ID1* e como alvo terapêutico, ao reduzir os níveis da proteína SP1 e seu gene alvo, *ANGPTL7* (Fei *et al.*, 2023).

No contexto da LPA, Nigten e colaboradores verificaram em modelos experimentais que o aumento de *ID1* estaria associado com a parada do ciclo celular e acúmulo das células em G0/G1, sugerindo uma inibição da proliferação do blasto leucêmico (Nigten *et al.*, 2005). Entretanto, esses dados precisam ser avaliados com cautela, posto que a expressão de *ID1* foi induzida por meio de vetores retrovirais. Logo, a hiperexpressão não seria representativa de conjuntura real. Ademais, estudos clínicos que avaliam o valor prognóstico de *ID1* na LPA são escassos.

Figura 9 – ID1 em diferentes vias associadas ao câncer.



Fonte: Adaptado de Zhao e colaboradores (2020).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar a associação da expressão gênica relativa de *ID1* com as características clínico-laboratoriais e os desfechos clínicos de pacientes com leucemia promielocítica aguda.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os níveis de expressão gênica relativa de *ID1* em amostras de medula óssea de pacientes adultos com LPA.
- Comparar as características clínico-laboratoriais entre os grupos de expressão de *ID1*.
- Verificar se a expressão aberrante de *ID1* tem impacto nos principais desfechos clínicos da doença (sobrevida global e sobrevida livre de doença).

4. Material e Métodos

4.1. Casuística e protocolo de tratamento

Foram incluídas neste estudo de coorte 226 amostras consecutivas de pacientes com LPA submetidos ao protocolos de tratamento IC-APL. O material escolhido para análise foi amostras de aspirado de medula óssea. Entretanto, nos casos em que não houve disponibilidade deste material, amostras de sangue periférico foram analisadas. Todos os pacientes foram diagnosticados no Serviço de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O diagnóstico de LPA foi baseada na detecção do padrão característico de *microspeckled* por meio da técnica de imunofluorescência (Falini *et al.*, 1997). A análise citogenética de t(15; 17) e/ou RT-PCR para o gene de fusão *PML-RAR α* foi obrigatório para confirmação do diagnóstico. Uma vez confirmado o diagnóstico, os pacientes foram classificados de acordo com o risco de recaída da doença, o qual leva em consideração contagens de leucócitos e plaquetas no sangue periférico no momento do diagnóstico (Sanz *et al.*, 2000). Resumidamente, os pacientes foram classificados como sendo de baixo risco de recaída se a contagem de leucócitos fosse abaixo $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ e plaquetas acima de $40 \times 10^3/\mu\text{l}$, como sendo de risco intermediário, quando apresentava contagem de leucócitos abaixo de $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ e plaquetas abaixo de $40 \times 10^3/\mu\text{l}$, e pacientes com alto risco de recaída quando apresentavam contagem de leucócitos acima de $10 \times 10^3/\mu\text{l}$.

As amostras de pacientes pertencem ao banco de células do referido laboratório, aprovado no processo de número 7147/2005 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes desse estudo receberam doses de

45 mg/m²/dia de Ácido *all-trans*retinoico (ATRA) por via oral a partir do primeiro dia da suspeita, fracionada em duas doses. Pacientes com menos de 20 anos receberam doses de 25 mg/m²/dia, também fracionadas em duas doses. O tratamento com ATRA foi contínuo até a remissão completa (RC) ou pelo prazo máximo de 90 dias em caso de persistência de promielócitos atípicos na medula óssea. Daunorrubicina também foi administrada nesses pacientes nos dias 2, 4, 6 e 8 de tratamento, por infusão endovenosa (20 minutos).

4.2. Extração de RNA total

O ácido ribonucleico (RNA) total das amostras de medula óssea e/ou sangue periférico dos pacientes acima descritos foi extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), o qual consiste numa solução monofásica à base de fenol e isotiocianato de guanidina, que deriva de uma modificação do método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987).

Por conseguinte, as amostras foram centrifugadas a 300x g por 10 minutos. Em seguida, o precipitado celular foi transferido para um tubo de polibreno estéril e livre de RNase, ao qual foram acrescentados 35 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos, composto de 9 partes de cloreto de amônio e 1 parte de bicarbonato de amônio, seguindo-se uma incubação em gelo por 20 minutos. Após o período de incubação, o lisado celular foi novamente centrifugado a 300 x g por 20 minutos e descartado o sobrenadante, deixando para trás um precipitado (*pellet*) de leucócitos. Este foi então ressuspendido em 1 mL de salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) [1x] e aliquotados em tubos de polibreno de 1,5 ml livres de RNase contendo o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), numa proporção de 3 partes de Trizol para 1 parte de células, e homogeneizados com a auxílio de pipeta.

A adição do reagente Trizol a suspensão celular serve para lisar os leucócitos e dissolver os componentes celulares enquanto a integridade do RNA é mantida.

A recuperação do RNA total é possível após a adição de 200 µl de clorofórmio, seguida de agitação vigorosa e centrifugação a 14,000 x g a 4°C por 15 minutos. A adição do clorofórmio separa a solução de Trizol e células em fase aquosa e fase orgânica. O RNA total permanece exclusivamente na fase aquosa. Esta foi então transferida para tubos novos de 1,5 mL livres de RNase e submetidas a precipitação do RNA total com a adição de 800 µl de álcool isopropílico [100%]. Após centrifugação a 14,000 x g a 4°C por 10 minutos e descarte do sobrenadante, o *pellet* de RNA total foi lavado com 1 mL etanol 70% e centrifugado a 10,000 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* posto para secar a temperatura ambiente. Finalmente, este foi dissolvido em água destilada e deionizada, tratada com o inibidor de RNase Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (SIGMA, EUA) e conservado em freezer a -80°C, até o momento do uso.

4.3. Quantificação do RNA total

Para mensurar a quantidade de ácidos nucleicos extraída, alíquotas de 1 µl de cada amostra foram submetidas à leitura da densidade ótica a 260 nm pelo espectrofotômetro *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Nesse comprimento de onda, os ácidos nucleicos apresentam absorbância máxima de radiação UV, de modo que as concentrações foram estimadas por meio da relação 1U de A260 = 40 µg de RNA/mL. A razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nanômetros (A260/A280) foi considerada como um indicativo de pureza das amostras, uma vez que a leitura a 280 nm permite estimar a

contaminação com proteínas. Foram utilizadas preparações apresentando razão A260/A280 entre 1,7 e 2.

4.4. Síntese da Primeira Fita do DNA Complementar

Uma vez extraído e quantificado, o RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, EUA). As reações ocorreram em volumes de 25 µl, contendo um micrograma de RNA Total, 2.5 µl de 10x *RT Buffer*, 1 µl de 25x dNTP *mixture*, 2.5 µl 10x *Random Primers*, 1.25 µl de *MultiScribe RT* (50U/µl), 0.65 µl de *RNasin® Plus RNase Inhibitor* (Promega, EUA) e H₂O deionizada tratada com DEPC 0,1% (SIGMA, EUA) suficiente para completar o volume final. As reações ocorreram durante 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 segundos a 85°C.

4.5. Avaliação da expressão do gene *ID1*

O padrão relativo de expressão gênica do gene *ID1* foi determinado pela técnica de RQ-PCR (do inglês, *Real-Time Quantitative PCR*). Neste método, o número de cópias amplificadas de um dado gene é proporcional à fluorescência quantificada pelo aparelho, oriunda da liberação e ativação de um fluorocromo ligado a uma sonda específica para o gene de interesse (método Taqman®). Para tanto, são utilizados *primers* e sonda específicos acoplada a dois fluorocromos diferentes em cada uma das extremidades. Na extremidade 5' existe um doador de elétrons chamado *reporter* e na extremidade 3' um receptor denominado de *quencher*. Quando a sonda encontra-se intacta, a proximidade entre os dois fluorocromos induz a uma supressão da fluorescência por meio de um fenômeno de transferência de energia conhecido como FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transference*). Durante a reação de RQ-PCR propriamente dita, a sonda é degradada pela atividade exonuclease da enzima

Taq polimerase, o que faz com que ocorra uma separação física entre os dois fluorocromos, permitindo, desta forma, a emissão de fluorescência pelo *reporter*. Esta fluorescência é proporcional à quantidade de sonda degradada e, consequentemente, proporcional ao produto de PCR formado ao longo da reação, permitindo, desse modo, uma análise em “tempo real” da reação.

Para realização deste ensaio, todas as amostras foram processadas em duplicatas em placas de 96 poços. A amplificação foi realizada em um volume final de 20 μ l, utilizando 5 μ l do cDNA diluído 5 vezes, 10 μ l do reagente 2X *TaqMan*® *Universal Master Mix* (Applied BioSystems, EUA) e 1 μ l de cada *primer*/sonda específica para o gene analisado. Os *primers* e sondas utilizadas na determinação do padrão de expressão gênica do gene *ID1* foram sintetizados pelo sistema *TaqMan*® *Gene Expression - Assay-on-Demand* sob código de identificação descrito (*Assay ID: Hs00357821_g1*, Applied Biosystems, EUA). A expressão do gene constitutivo da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi utilizada para normalização da expressão do gene *ID1*, de modo a compensar diferenças na quantidade de cDNA utilizadas em cada reação, devidas a erros de pipetagem. Os experimentos foram realizados no aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA), utilizando-se o software *7500 v2.0.5* para análise (Applied BioSystems, EUA).

Para determinar os níveis relativos de expressão do gene *ID1*, utilizou-se o método *Comparative Cycle Threshold* (Ct). Portanto, uma vez concluída a reação, um limite de fluorescência na fase exponencial de amplificação é estipulado, de forma a determinar o ciclo (Ct) no qual a fluorescência decorrente da amplificação de cada amostra foi superior à fluorescência inespecífica emitida. Amostras que apresentaram expressão do gene constitutivo *GAPDH* detectável após o Ct de número 30, foram excluídas da análise. Para normalizar os valores de Ct para as diferentes amostras,

de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, ou mesmo diferenças na eficiência da transcrição de cada amostra, o determinado Ct de cada amostra é subtraído pelo Ct do seu respectivo gene constitutivo (*GAPDH*), gerando assim o ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{\text{amostra}} - Ct_{\text{GAPDH}}$). Para um mesmo gene, os valores de ΔCt podem ser diretamente comparados de maneira a obtermos uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. Entretanto, foi utilizado o RNA da linhagem celular NB4 como referência da reação, por sabidamente ser uma linhagem de leucemia promielocítica aguda (com presença do rearranjo gênico *PML/RAR α*). A diferença entre o ΔCt de uma amostra teste e o ΔCt da amostra de uma referência ($\Delta\Delta Ct$) reflete a diferença existente entre as amostras analisadas. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa pode ser obtida de forma aproximada aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.6. Estratégia de dicotomização e análise estatística

A fim de avaliar o impacto da expressão do gene *ID1* sobre a evolução clínica dos pacientes com LPA, foram utilizadas duas estratégias diferentes na definição de ponto de corte ideais para as variáveis contínuas: primeiro, dividimos a coorte total em quartis (q) de acordo com os níveis de expressão do gene *ID1*. Com base nas curvas de sobrevida (usando a sobrevida global como desfecho primário), foram agrupados quartis com probabilidades de eventos semelhantes. Em seguida, confirmamos essas descobertas usando *Receiver Operating Characteristic* (ROC) e *C index*. De acordo com esses critérios, os pacientes foram dicotomizados em menor expressão do gene *ID1* (do primeiro ao terceiro quartil) e maior expressão (quarto quartil). O teste exato de Fisher ou o teste qui-quadrado, conforme apropriado, foi usado para comparar

variáveis categóricas. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar variáveis contínuas.

4.7. Desfechos

O seguimento dos pacientes foi atualizado até abril de 2019. Os pacientes em que o seguimento foi perdido foram censurados na última data em que sabidamente estavam vivos. Potenciais fatores prognósticos incluíram idade ao diagnóstico, gênero, contagem de glóbulos brancos e plaquetas, ponto de quebra do gene *PML*, níveis de expressão do gene *ID1* e *status* mutacional do gene *FLT3*. A mortalidade precoce foi definida como morte nos primeiros 30 dias após o diagnóstico. Remissão hematológica completa (RC) foi definida como aspirados de medula óssea normocelulares, contendo menos de 5% de blastos leucêmicos e com evidências de maturação normal dos outros elementos, bem como a não visualização de blastos leucêmicos circulantes ou evidência de leucemia extramedular. Recaída foi definida como a presença de 5% ou mais de blastos na medula óssea, presença de blastos leucêmicos circulantes no sangue periférico, ou o desenvolvimento de leucemia extramedular.

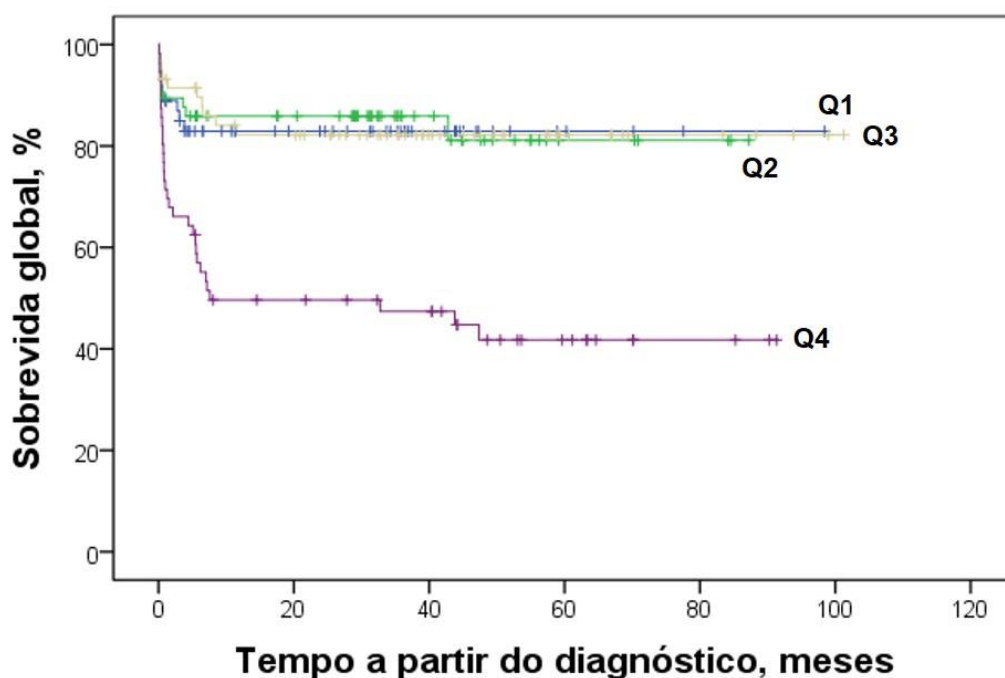
Sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) foram calculados usando o método Kaplan-Meier. Sobrevida global (SG) refere-se ao tempo compreendido entre o diagnóstico e o óbito/censura. Sobrevida livre de doença (SLD) é o tempo entre a remissão completa e o primeiro evento: recaída ou óbito. O teste log-rank foi utilizado para comparações das curvas de Kaplan-Meier. Para a análise multivariada, um modelo de risco proporcional de Cox foi utilizado para a SG e SLD. A análise de regressão de riscos proporcionais univariada e multivariada foi realizada para potenciais fatores prognósticos para SG e SLD. Os potenciais fatores prognósticos examinados na análise de regressão multivariada foram os seguintes:

idade ao diagnóstico, sexo e contagem de leucócitos. Todos os valores de P foram ajustados para os dois lados, com nível de significância de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, EUA), STATA versão 14.9 e o *software* R.3.3.2 (The CRAN project, www.r-project.org) com o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

A análise de expressão gênica foi realizada em 226 pacientes com LPA. Optamos por agrupar arbitrariamente os pacientes de acordo com os valores dos quartis de expressão de *ID1* das amostras leucêmicas, como descrito nos Materiais e Métodos (Figura 10).

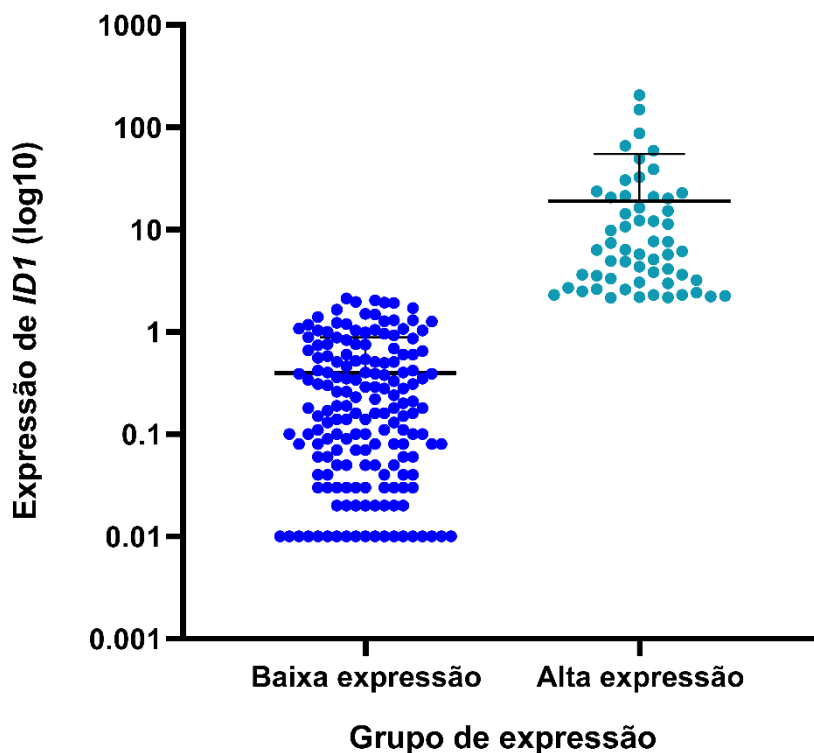
Figura 10 – Distribuição das curvas de sobrevida global de acordo com os grupos de quartis com probabilidades de eventos semelhantes.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Os níveis de transcrição de *ID1* tiveram um valor médio de 0,4 (intervalo: 0,1-207), onde os quartis de expressão se apresentaram como Q1<0.08, Q2≥ 0.08 e <0.39, Q3≥ 0.39 e <2.16, Q4>2,16. Deste modo, organizamos os grupos em baixa expressão de *ID1* para valores entre 0,1-2,16 (n=169), e alta expressão com níveis maiores que 2,16 (n=57) (Figura 11).

Figura 11 – Expressão de *ID1* nos grupos de alta e baixa expressão.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

As características clínicas e laboratoriais dos dois grupos foram então comparadas e estão resumidas na Tabela 1. Essas características foram semelhantes entre pacientes com expressão baixa e alta expressão de *ID1*, exceto por contagens mais altas de leucócitos (WBC) em pacientes que tinham alta expressão de *ID1* ($p=0,031$) (Tabela 1). De acordo com os critérios PETHEMA-GIMEMA, os 85 pacientes que apresentaram ao diagnóstico contagens de leucócitos acima de $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Sanz *et al.*, 2015), foram classificados como alto risco de recaída em: 33% para baixa expressão de *ID1* e 52% para alta expressão de *ID1* ($p<0,039$).

Tabela 1 – Características clínicas e laboratoriais de pacientes com LPA de acordo com a expressão gênica de *ID1*.

Características dos pacientes	Total (n = 226)	Expressão de <i>ID1</i> (n=226)		p-valor
		Baixa, (n=169)	Alta, (n=57)	

Gênero, n (%)				0,284
Feminino	123	89 (52,4%)	34 (60,7%)	
Masculino	103	81 (47,6%)	22 (39,3%)	
Idade ^{&} , anos	35 (18 – 82)	35,1 (18 – 82)	35 (18 – 81)	0,983
ECOG <i>performance status</i>				0,063
0	109 (54,5%)	82 (55%)	27 (52,9%)	
1	48 (24%)	40 (26,8%)	8 (15,7%)	
2	17 (8,5%)	12 (8,1)	5 (9,8%)	
≥3	26 (13%)	15 (10,1%)	11 (21,6%)	
Não determinado	26	21	5	
Risco de recaída n(%)†				0,039*
Baixo	41 (18,1%)	34 (20%)	7 (12,5%)	
Intermediário	100 (44,2%)	80 (47,1%)	20 (35,7%)	
Alto	85 (37,6%)	56 (32,9%)	29 (51,8%)	
Subtipo morfológico				0,552
Hipogranular	16 (7,1%)	11 (6,5%)	5 (8,9%)	
Hipergranular	210 (92,9%)	159 (93,5%)	51 (91,1%)	
Ponto de quebra do <i>PML</i>				0,554
BCR1	106 (57,9%)	83 (60,1%)	23 (51,1%)	
BCR2	6 (3,3%)	4 (2,9%)	2(4,4%)	
BCR3	71 (38,8%)	51 (37%)	20 (44,4%)	
Não determinado	43	32	11	
WBC ^{&} x 10 ⁹ /L	4,5 (0,8 – 134)	3,5 (0,8 – 128)	10,3 (0,2 – 134)	0,031*
PLT ^{&} x 10 ⁹ /L	25 (7 – 230)	25 (7 – 230)	24 (1 – 128)	0,379
Hemoglobina ^{&} (g/dL)	8,6 (3,2 – 14,9)	8,7 (3,2 – 14,9)	8,4 (4,8 – 12,8)	0,351
Creatinina ^{&} (g/dL)	0,8 (0,3 – 4,3)	0,8 (0,3 – 4,3)	0,8 (0,4 – 1,8)	0,731
Ácido úrico ^{&} (mg/dL)	3,7 (1,1 – 10,3)	3,7 (1,1 – 10,3)	3,8 (1,2 – 8,1)	0,816
Fibrinogênio ^{&} (mg/dL)	162 (10 – 898)	171 (10 – 898)	158 (10 – 549)	0,345
Albumina ^{&} (g/dL)	4 (2,2 – 5,4)	4 (2,2 – 5,4)	3,9 (2,2 – 4,9)	0,182
RC, %	82	85	73	0,046*
SG em 5 anos, % (IC, 95%)	74 (68 – 80)	83 (76 – 89)	41 (28 – 54)	<0,001*
SLD em 5 anos % (IC, 95%)	84 (78 – 90)	86 (78 – 92)	74 (55 – 85)	0,031

Abreviações: PLT: Plaquetas; RC: remissão completa; SG: Sobrevida global; SLD: Sobrevida livre de doença; WBC: do inglês, *White Blood Cell* (células brancas do sangue).

& Valores são representados pela mediana (intervalo).

† Risco de recaída: Baixo risco: $WBC \leq 10 \times 10^3/\mu l$ e $PLT > 40 \times 10^3/\mu l$; Risco Intermediário: $WBC \leq 10 \times 10^3/\mu l$ e $PLT \leq 40 \times 10^3/\mu l$; Alto risco: $WBC > 10 \times 10^3/\mu l$.

* Foi adotado como significativo um valor de p menor que 5%.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

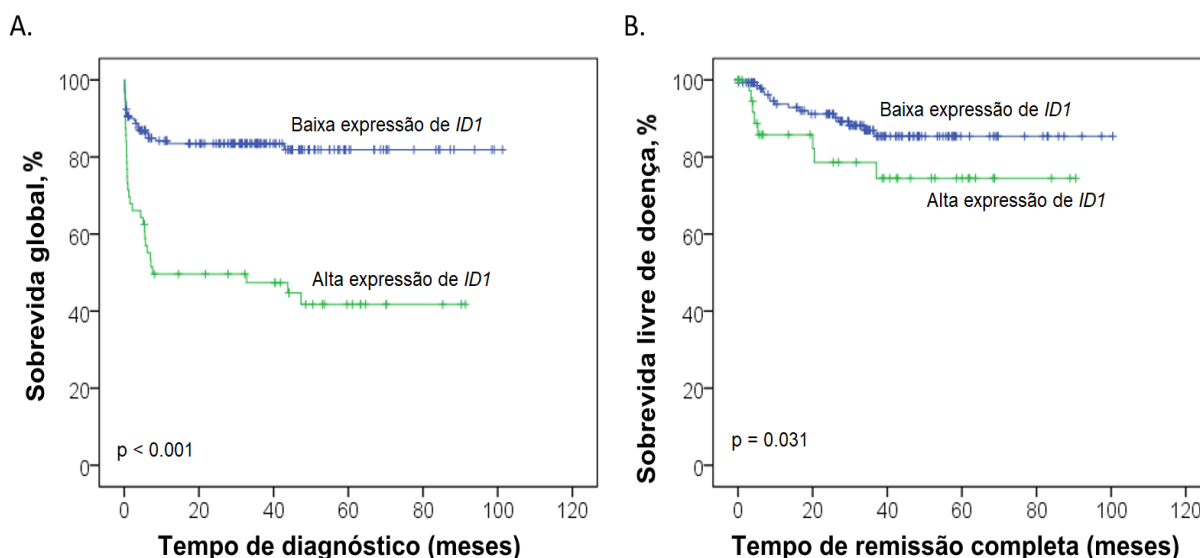
No geral, 186 (82%) dos 226 pacientes alcançaram remissão hematológica completa (RC). O tempo médio para atingir a remissão hematológica completa foi de 39 dias (intervalo: 12-389 dias). 22 pacientes tiveram morte precoce ocasionadas por hemorragia (n=16), seguido por infecção (n=5) e síndrome de diferenciação (resistência ao ATRA, n=1). Pacientes com alta expressão de *ID1* tiveram menor taxa de remissão completa (73%) em comparação com aqueles com baixa expressão de *ID1* (85%) ($p=0,046$). O acompanhamento médio entre os sobreviventes foi de 39 meses (intervalo de confiança [IC] de 95%: 36-43 meses), com SG estimada em 5 anos de 74% (IC 95%: 68-80%) e SLD estimada em 5 anos de 84% (IC 95%: 78–90%) (Tabela 1).

Pacientes com alta expressão de *ID1* tiveram uma SG estimada em 5 anos menor (41%, IC 95%: 28–54%) quando comparados com os pacientes com baixa expressão de *ID1* (83%, 95% IC: 76–89%) ($P<0,001$) (Figura 12A). Este resultado foi consistente com a análise multivariada de riscos proporcionais (Tabela 2). Em relação à SLD estimada em 5 anos, os pacientes com alta expressão de *ID1* tiveram valores significativamente menores (74%, IC de 95%: 55-85%) em comparação com pacientes com baixa expressão de *ID1* (86%, IC de 95%: 78-92%) ($p=0,031$) (Figura 12B). No entanto, essa diferença não foi mantida na análise multivariada (Tabela 2).

Considerando a importância dos critérios PETHEMA-GIMEMA para predição de recaída (Sanz *et al.*, 2000), avaliamos o impacto da expressão de *ID1*

separadamente em pacientes com doença de baixo, intermediário e alto risco. Para pacientes de baixo risco (41 pacientes; 18%), a expressão de *ID1* não teve impacto na RC ($p=1,00$), SG ($p=0,059$) ou SLD ($p=0,408$). Resultados semelhantes foram observados para pacientes de risco intermediário (100 pacientes; 45%; RC, $p=0,11$; SLD, $p=0,085$), exceto por uma taxa de SG significativamente menor em pacientes com alta expressão de *ID1* ($p<0,001$). Em contraste, pacientes de alto risco com alta expressão de *ID1* (29 pacientes; 52%) tiveram uma taxa de SG estimada em 5 anos mais baixa (23%, IC 95%: 8–42) do que aqueles com baixa expressão de *ID1* (62%, 95% IC: 45–75) ($p=0,0047$).

Figura 12 – Comparação da sobrevida global (Figura 12A) e sobrevida livre de doença (Figura 12B) para pacientes com LPA de acordo com a expressão de *ID1*.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A tabela 2 mostra a análise de riscos proporcionais de Cox para SG e SLD. A expressão de *ID1* manteve seu valor prognóstico significativo na análise multivariada (Risco proporcional, do inglês, *hazard ratio*) HR: 2,1, IC 95%: 1,2–4,1; $p=0,04$), considerando mutações de *FLT3-ITD* e gênero como fatores de confusão. A

expressão de *ID1* não teve impacto nas taxas de RC (p=0,308) e SLD (p=0,83) em pacientes de alto risco.

Tabela 2 – Análise multivariada de Cox para a sobrevida global e sobrevida livre de doença.

Variável	Sobrevida global				Sobrevida livre de doença			
	HR	95% IC		p-valor	HR	95% IC		p-valor
Gênero: masculino <i>versus</i> feminino	0.81	0.44	1.46	0.492	1.03	0.41	2.58	0.948
Risco de recaída: alto <i>versus</i> intermediário/baixo	1.83	1.12	3.01	0.017	2.14	0.99	2.31	0.05
FLT3-ITD <i>status</i> : mutado <i>versus</i> não-mutado	1.86	0.99	3.47	0.05	0.64	0.41	2.58	0.499
Expressão de <i>ID1</i> : Q4 <i>versus</i> Q1–Q3	2.95	1.63	5.28	<0.001	1.23	0.46	3.26	0.67

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados em nosso estudo demonstraram que a expressão aberrante do gene *ID1* foi associada aos desfechos clínicos de pacientes com LPA tratados com ATRA e quimioterapia. Corroborando nossos achados, outros grupos associaram maiores níveis de expressão de *ID1* com desfechos clínicos em tumores humanos (Zhao *et al.*, 2020). A exemplo disso, Ponz-Sarvisé e cols. observaram menores taxas de SG e SLD em câncer de pulmão nos pacientes com hiperexpressão de *ID1* (Ponz-Sarvisé *et al.*, 2011). De forma semelhante, esses piores desfechos clínicos foram observados por Wazir e colaboradores, ao comparar os perfis de expressão de *ID1* dos tecidos de carcinoma mamário (n=152) e tecidos normais adjacentes (n=31) com dados clínicos (Wazir *et al.*, 2013). Para mais, Zuniga e colaboradores relataram uma pior SLD em pacientes com carcinoma ductal pancreático e alta expressão de *ID1*. Simultaneamente, houve associação significativa relacionada à resistência à radioterapia (Zuniga *et al.*, 2022).

No contexto das neoplasias hematológicas, o nosso grupo demonstrou que a expressão aberrante de *ID1* foi um fator preditor para uma menor sobrevida global em pacientes adultos com LMA (não-LPA) (Lima *et al.*, 2023). Embora outros grupos tenham mostrados resultados semelhantes, (Tang *et al.* 2009; Damm *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2015), pouco se sabe sobre a expressão deste gene e sua associação com desfechos clínicos na LPA. Muito disso se dá pelo fato de que hoje a LPA é considerada uma doença potencialmente curável, desde que o tratamento seja iniciado imediatamente após o diagnóstico (Sanz *et al.*, 2019).

Outro ponto de inflexão se dá quanto ao protocolo terapêutico utilizado para o tratamento dos pacientes. A partir da elucidação das bases moleculares da LPA, o emprego da terapia-alvo com os agentes diferenciadores (ATRA) e indutores de

apoptose (ATO) desempenharam um papel importante no tratamento da doença, sem o uso de quimioterapia e seus efeitos adversos. Embora os pacientes de baixo e risco intermediário possam se beneficiar da terapêutica livre de quimioterapia citotóxica, a combinação isolada de ATRA e ATO não é recomendada para tratar os pacientes considerados de alto risco (Sanz *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2020).

Adicionalmente, em razão da indisponibilidade do ATO nos centros públicos de saúde dos países em desenvolvimento, os protocolos que utilizam esse medicamento não são amplamente aplicados na prática clínica (Rego *et al.*, 2013; CONITEC, Brasil, 2014). Mesmo a rede IC-APL trazendo melhorias no manejo clínico da LPA sem a utilização do ATO, a probabilidade de recaída ainda é significativamente maior no subconjunto de pacientes de alto risco, com uma taxa de recaída de 15 a 25% após a terapia com ATRA e antraciclina (De Botton *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2013; Sanz *et al.*, 2014; Jimenez *et al.*, 2020). Nesse subconjunto de pacientes que recaem, o uso do ATO demonstrou ter uma eficácia clínica considerável, com uma média de 85% dos pacientes alcançando remissões completas (Soignet *et al.*, 2001; Watts *et al.*, 2014; Jimenez *et al.*, 2020). Diante disso, os desafios atuais mais importantes na doença incluem a morte precoce, que ocorre antes e durante a terapia de indução, e a otimização do tratamento em pacientes de alto risco (Sanz *et al.*, 2019).

Observamos que expressão aberrante do gene *ID1* foi capaz de subestratificar pacientes de alto risco de recaída, identificando aqueles que apresentam maiores chances de reincidência da doença. Com base nessa premissa, nosso grupo (Lucena-Araujo *et al.*, 2019) e outros (Hecht *et al.*, 2017) demonstraram consistentemente que pacientes tratados com ATRA e protocolos baseados em quimioterapia podem ser melhor estratificados de acordo com o seu perfil molecular. A abordagem em questão permitiu não apenas a identificação de pacientes que

sofreram morte precoce, como também daqueles com maior chance de recaída. Alguns desses marcadores podem estratificar ainda melhor os pacientes, independentemente da contagem de leucócitos, e podem ser implementados com esforço mínimo. Mais importante ainda, um grupo de pacientes associados a um perfil molecular desfavorável poderia ser monitorado em intervalos mais curtos para permitir intervenções precoces, antes que ocorresse uma recaída hematológica. Na melhor das hipóteses, este grupo selecionado de pacientes poderia ser elegível para receber ATO como estratégia de consolidação.

7. CONCLUSÕES

- Foram observadas contagens mais elevadas de leucócitos nos pacientes que tinham alta expressão de *ID1*.
- A expressão aberrante de *ID1* no grupo de pacientes de alto risco esteve associada a taxas piores de SG e SLD
- Na análise multivariada, a hiperexpressão de *ID1* não se manteve associada a uma pior SG.

REFERÊNCIAS

ALCALAY, Myriam et al. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 11, p. 1751-1761, 2003.

ARNOULD, Cécile et al. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor α in acute promyelocytic-like leukaemia. **Human molecular genetics**, v. 8, n. 9, p. 1741-1749, 1999.

BAFAIL, Mohammed A. et al. Favorable outcome of PML-RAR α short isoform and FLT3-ITD mutation in a patient with several adverse prognostic markers: A case report. **Clinical Case Reports**, v. 11, n. 7, p. e07637, 2023.

BAI, Ge et al. Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1. **Developmental cell**, v. 13, n. 2, p. 283-297, 2007.

BENNETT, John M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias French-American-British (FAB) co-operative group. **British journal of haematology**, v. 33, n. 4, p. 451-458, 1976.

BERNARD, Jean et al. Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. **Blood**, v. 41, n. 4, p. 489-496, 1973.

BÍBLIA, A.T. Isaías 40:31. Português. Bíblia NVI. Tradução: Biblica Brasil. Editora Vida. 2001.

BLOMHOFF, Rune; BLOMHOFF, Heidi Kiil. Overview of retinoid metabolism and function. **Journal of neurobiology**, v. 66, n. 7, p. 606-630, 2006.

BREEN, Karen A.; GRIMWADE, David; HUNT, Beverley J. The pathogenesis and management of the coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia. **British journal of haematology**, v. 156, n. 1, p. 24-36, 2012.

CASTAÑÓN, Eduardo; Ignacio Gil-Bazo. ID1 (inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein) **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**. 2012-09-01.

CATALANO, Alberto et al. The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 110, n. 12, p. 4073-4076, 2007.

CHEN, Yirui et al. TBLR1 fuses to retinoid acid receptor a in a variant t (3; 17)(q26; q21) translocation of acute promyelocytic leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 124, n. 6, p. 936-945, 2014.

CHEN, Zhu et al. Fusion between a novel Krüppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t (11; 17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. **The EMBO journal**, v. 12, n. 3, p. 1161-1167, 1993.

CHENG, Chi Keung et al. FNDC3B is another novel partner fused to RARA in the t (3; 17)(q26; q21) variant of acute promyelocytic leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 19, p. 2705-2709, 2017.

CHOMCZYNSKI, Piotr; SACCHI, Nicoletta. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

COREY, S. J. et al. A non-classical translocation involving 17q12 (retinoic acid receptor alpha) in acute promyelocytic leukemia (APML) with atypical features. **Leukemia**, v. 8, n. 8, p. 1350-1353, 1994.

CONITEC, Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias. Trióxido de arsênio para o tratamento da Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) 2014.

COREY, S. J. et al. A non-classical translocation involving 17q12 (retinoic acid receptor alpha) in acute promyelocytic leukemia (APML) with atypical features. **Leukemia**, v. 8, n. 8, p. 1350-1353, 1994.

DAENEN, S. et al. Retinoic acid as antileukemic therapy in a patient with acute promyelocytic leukemia and Aspergillus pneumonia. 1986.

DAVER, Naval et al. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. **Leukemia**, v. 33, n. 2, p. 299-312, 2019.

DE BOTTON, S. et al. Incidence, clinical features, and outcome of all trans-retinoic acid syndrome in 413 cases of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 92, n. 8, p. 2712-2718, 1998.

DE LA SERNA, Javier et al. Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 111, n. 7, p. 3395-3402, 2008.

DÖHNER, Hartmut et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 4, p. 424-447, 2017.

DÖHNER, Hartmut et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 140, n. 12, p. 1345-1377, 2022.

DUBOIS, Carolline et al. Hematopoietic growth factor expression and ATRA sensitivity in acute promyelocytic blast cells. **Blood**, v. 83, n. 11, p. 3264-3270, 1994.

FALANGA, A. et al. Cancer procoagulant and tissue factor are differently modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 92, n. 1, p. 143-151, 1998.

FALINI, Brunangelo et al. Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukemia (M3) with the monoclonal antibody PG-M3 (anti-PML). **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 90, n. 10, p. 4046-4053, 1997.

FEI, Ming-Yue et al. The non-cell-autonomous function of ID1 promotes AML progression via ANGPTL7 from the microenvironment. **Blood**, v. 142, n. 10, p. 903-917, 2023.

GREER, John. P. et al. Wintrobe's Clinical Hematology. [s.l.] Wolters Kluwer/Lippincott Williams [et] Wilkins, 2014.

GRIGNANI, Francesco et al. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RARa fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. **Cell**, v. 74, n. 3, p. 423-431, 1993.

GUO, Ailan et al. The function of PML in p53-dependent apoptosis. **Nature cell biology**, v. 2, n. 10, p. 730-736, 2000.

HAMBLEY, Bryan C.; TOMULEASA, Ciprian; GHIAUR, Gabriel. Coagulopathy in acute promyelocytic leukemia: can we go beyond supportive care?. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 722614, 2021.

HECHT, Anna et al. Validation of a molecular risk score for prognosis of patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy-containing regimens. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 17, n. 12, p. 889-896. e5, 2017.

HILLESTAD, Leif K. "Acute promyelocytic leukemia." *Acta Medica Scandinavica* 159.3 (1957): 189-194.

HONG, Seok-Ho et al. ID1 and ID3 represent conserved negative regulators of human embryonic and induced pluripotent stem cell hematopoiesis. **Journal of cell science**, v. 124, n. 9, p. 1445-1452, 2011.

MENG-ER, Huang et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 72, n. 2, p. 567-572, 1988.

IYER, Sunil Girish et al. The treatment of acute promyelocytic leukemia in 2023: Paradigm, advances, and future directions. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 1062524, 2023.

JÁCOMO, Rafael Henriques et al. Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. **haematologica**, v. 92, n. 10, p. 1431-1432, 2007.

JANKOVIC, Vladimir et al. Id1 restrains myeloid commitment, maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 4, p. 1260-1265, 2007.

JEN, Yale; WEINTRAUB, Harold; BENEZRA, Robert. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. **Genes & development**, v. 6, n. 8, p. 1466-1479, 1992.

JIANG, Yanan, et al. "An overview of arsenic trioxide-involved combined treatment algorithms for leukemia: basic concepts and clinical implications." **Cell Death Discovery** 9.1 (2023): 266.

JIMENEZ, Joaquin J., et al. "Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature." **Oncotarget** 11.11 (2020): 992.

KAKIZUKA, A. et al. Chromosomal translocation t (15; 17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARa with a novel putative transcription factor, PML. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 663-674, 1991.

KWAAN, Hau C.; CULL, Elizabeth H. The coagulopathy in acute promyelocytic leukaemia—what have we learned in the past twenty years. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 27, n. 1, p. 11-18, 2014.

LEHMANN, Sören et al. Early death rates remain high in high-risk APL: update from the Swedish Acute Leukemia Registry 1997–2013. **Leukemia**, v. 31, n. 6, p. 1457-1459, 2017.

LI, Ji et al. GTF 2I-RARA is a novel fusion transcript in at (7; 17) variant of acute promyelocytic leukaemia with clinical resistance to retinoic acid. **British journal of haematology**, v. 168, n. 6, p. 904-908, 2015.

LIANG, Chengyuan, et al. "Overview of all-trans-retinoic acid (ATRA) and its analogues: structures, activities, and mechanisms in acute promyelocytic leukaemia." **European Journal of Medicinal Chemistry** 220 (2021): 113451.

LUCENA-ARAUJO, Antonio R., et al. "Internal tandem duplication of the FLT3 gene confers poor overall survival in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia study." **Annals of hematology** 93 (2014): 2001-2010.

LUCENA-ARAUJO, Antonio R., et al. "Combining gene mutation with gene expression analysis improves outcome prediction in acute promyelocytic leukemia." **Blood, The Journal of the American Society of Hematology** 134.12 (2019): 951-959.

MAN, Na et al. Differential role of Id1 in MLL-AF9–driven leukemia based on cell of origin. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 19, p. 2322-2326, 2016.

Ministério da Saúde. Portaria nº 705, de 12 de Agosto de 2014. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda do Adulto. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 12 de Agosto de 2014.

Madan, Vikas, et al. "Comprehensive mutational analysis of primary and relapse acute promyelocytic leukemia." **Leukemia** 30.8 (2016): 1672-1681.

MANNAN, Abdul et al. Genotypic and phenotypic characteristics of acute promyelocytic leukemia translocation variants. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 13, n. 4, p. 189-201, 2020.

MISTRY, Helena et al. Small-molecule inhibitors of USP1 target ID1 degradation in leukemic cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, n. 12, p. 2651-2662, 2013.

MÜLLER-TIDOW, Carsten et al. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 7, p. 2890-2904, 2004.

OKEN, Martin M. et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **American journal of clinical oncology**, v. 5, n. 6, p. 649-656, 1982.

PANDOLFI, Pier Paolo et al. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for oncoprotein-targeted cure. **Cancer cell**, v. 32, n. 5, p. 552-560, 2017.

PEREZ, A. et al. PMLRAR homodimers: distinct DNA binding properties and heteromeric interactions with RXR. **The EMBO journal**, v. 12, n. 8, p. 3171-3182, 1993.

PERK, Jonathan; IAVARONE, Antonio; BENEZRA, Robert. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 8, p. 603-614, 2005.

PERRY, S. Scott et al. Id1, but not Id3, directs long-term repopulating hematopoietic stem-cell maintenance. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 110, n. 7, p. 2351-2360, 2007.

PRABHU, Sumangala et al. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 10, p. 5888-5896, 1997.

PONZ-SARVISÉ, Mariano et al. Inhibitor of differentiation-1 as a novel prognostic factor in NSCLC patients with adenocarcinoma histology and its potential contribution to therapy resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 12, p. 4155-4166, 2011.

REGO, Eduardo Magalhães; JÁCOMO, Rafael Henriques. Epidemiology and treatment of acute promyelocytic leukemia in Latin America. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 3, n. 1, 2011.

REGO, Eduardo M. et al. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 121, n. 11, p. 1935-1943, 2013.

ROMAN DIAZ, Jaime L.; VAZQUEZ MARTINEZ, Mariola; KHIMANI, Farhad. New Approaches for the Treatment of AML beyond the 7+ 3 Regimen: Current Concepts and New Approaches. **Cancers**, v. 16, n. 3, p. 677, 2024.

ROSCHGER, Cornelia; CABRELE, Chiara. The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways. **Cell Communication and Signaling**, v. 15, n. 1, p. 1-26, 2017.

ROWLEY, Janet D. et al. Further evidence for a non-random chromosomal abnormality in acute promyelocytic leukemia. **International Journal of Cancer**, v. 20, n. 6, p. 869-872, 1977.

RYAN, Meaghan M. Acute promyelocytic leukemia: a summary. **Journal of the advanced practitioner in oncology**, v. 9, n. 2, p. 178, 2018.

RUZINOVA, Marianna B. et al. Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. **Cancer cell**, v. 4, n. 4, p. 277-289, 2003.

SANZ, Miguel A.; MONTESINOS, Pau. How we prevent and treat differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 18, p. 2777-2782, 2014.

SANZ, Miguel A. et al. All-trans retinoic acid with daunorubicin or idarubicin for risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukaemia: a matched-pair analysis of the PETHEMA LPA-2005 and IC-APL studies. **Annals of hematology**, v. 94, p. 1347-1356, 2015.

SANTANA-HERNÁNDEZ, Jennifer et al. Acute promyelocytic leukemia with PML/RARA (bcr1, bcr2 and bcr3) transcripts in a pediatric patient. **Oncology Letters**, v. 27, n. 3, p. 1-8, 2024.

SEER data base: Cancer Stat Facts: Leukemia — Acute Myeloid Leukemia (AML – 2022).

SONG, Xiaolu et al. Incidence, survival, and risk factors for adults with acute myeloid leukemia not otherwise specified and acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities: analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database, 2001–2013. **Acta haematologica**, v. 139, n. 2, p. 115-127, 2018.

STAHL, Maximilian; TALLMAN, Martin S. Differentiation syndrome in acute promyelocytic leukaemia. **British journal of haematology**, v. 187, n. 2, p. 157-162, 2019.

SUN, Xiao-Hong et al. Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. **Molecular and cellular biology**, v. 11, n. 11, p. 5603-5611, 1991.

TALLMAN, Martin S.; ALTMAN, Jessica K. Curative strategies in acute promyelocytic leukemia. **ASH Education Program Book**, v. 2008, n. 1, p. 391-399, 2008.

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

TOURNAY, Olivia; BENEZRA, Robert. Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 5, p. 2418-2430, 1996.

VAKITI, Anusha; MEWAWALLA Perna. Acute Myeloid Leukemia. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.

VALDIMARSDOTTIR, Gudrun, et al. "Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells." **Circulation** 106.17 (2002): 2263-2270.

VAN DEN BERGHE, H. A. A. G. R. J. G., et al. "Chromosome abnormalities in acute promyelocytic leukemia (APL)." **Cancer** 43.2 (1979): 558-562.

VITALIANO-PRUNIER, Adeline et al. Clearance of PML/RARA-bound promoters suffice to initiate APL differentiation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 124, n. 25, p. 3772-3780, 2014.

WAZIR, Umar et al. The mRNA expression of inhibitors of DNA binding-1 and-2 is associated with advanced tumour stage and adverse clinical outcome in human breast cancer. **Anticancer research**, v. 33, n. 5, p. 2179-2183, 2013.

WANG, Lan et al. The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation. **Science**, v. 333, n. 6043, p. 765-769, 2011.

WANG, Zhen-Yi; CHEN, Zhu. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 111, n. 5, p. 2505-2515, 2008.

WANG, Lan et al. Regulation of AKT signaling by Id1 controls t (8; 21) leukemia initiation and progression. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 126, n. 5, p. 640-650, 2015.

WELLS, Richard A.; CATZAVELOS, Charles; KAMEL-REID, Suzanne. Fusion of retinoic acid receptor α to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. **Nature genetics**, v. 17, n. 1, p. 109-113, 1997.

WILLIAMS, Samuel A. et al. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 918-930, 2011.

WON, Dahae et al. OBFC2A/RARA: a novel fusion gene in variant acute promyelocytic leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 121, n. 8, p. 1432-1435, 2013.

YAMAMOTO, Yukiya et al. BCOR as a novel fusion partner of retinoic acid receptor alpha in at (X; 17)(p11; q12) variant of acute promyelocytic leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 116, n. 20, p. 4274-4283, 2010.

YILMAZ, Musa; KANTARJIAN, Hagop; RAVANDI, Farhad. Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. **Blood cancer journal**, v. 11, n. 6, p. 123, 2021.

YIN, C. Cameron et al. Identification of a novel fusion gene, IRF2BP2-RARA, in acute promyelocytic leukemia. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 13, n. 1, p. 19-22, 2015.

ZHAO, Zhengxiao et al. Inhibitor of differentiation 1 (Id1) in cancer and cancer therapy. **International journal of medical sciences**, v. 17, n. 8, p. 995, 2020.

ZHOU, Jing-Dong et al. Clinical significance of up-regulated ID1 expression in Chinese de novo acute myeloid leukemia. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 5, p. 5336, 2015.

ZUNIGA, Oscar; BYRUM, Stephanie; WOLFE, Adam R. Discovery of the inhibitor of DNA binding 1 as a novel marker for radioresistance in pancreatic cancer using genome-wide RNA-seq. **Cancer Drug Resistance**, v. 5, n. 4, p. 926, 2022.