

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Leucemia Promielocítica Aguda da Infância:
caracterização de alterações por citogenética
clássica e molecular, anticorpo monoclonal
(PG-M3) e biologia molecular**

BETHÂNIA DE ARAÚJO SILVA AMARAL

**Recife, PE
Maio, 2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Leucemia Promielocítica Aguda da Infância:
caracterização de alterações por citogenética
clássica e molecular, anticorpo monoclonal (PG-M3)
e biologia molecular**

BETHÂNIA DE ARAÚJO SILVA AMARAL

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco** como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Genética** pela UFPE

Orientador: Prof^a Dra. Neide Santos
Laboratório de Genética e Citogenética Animal/Depto. de Genética/CCB
(UFPE)

Co-orientador:

Dra. Maria Luiza Marcedo Silva.
Laboratório de Citogenética do CEMO (INCA-RJ)

Amaral, Bethânia de Araújo Silva

Leucemia promielocítica aguda da infância: caracterização de alterações por citogenética clássica e molecular, anticorpo monoclonal (PG-M3) e biologia molecular / Bethânia de Araújo Silva Amaral. – Recife: O Autor, 2009.

81 folhas: il., tab .

Orientadores: Neide Santos e Maria Luiza Marcedo Silva.

Disseratação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Mestrado em Genética e Biologia Molecular, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Leucemia promielocítica aguda – Análise 2. Leucemia promielocítica aguda – Diagnóstico molecular 3. Citogenética I
Título.**

616.99419 CDD(22.ed.)

**UFPE
CCB – 2009- 146**

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

Parecer da comissão examinadora da dissertação de:

BETHÂNIA DE ARAÚJO SILVA AMARAL

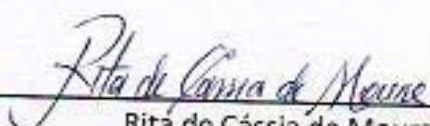
Leucemia Promielocítica Aguda da Infância: caracterização de alterações por citogenética clássica e molecular, anticorpo monoclonal (PG-M3) e biologia molecular

A comissão examinadora considera o presente trabalho APROVADO.

Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, BETHÂNIA DE ARAÚJO SILVA AMARAL, faz jus ao grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela UFPE.

Recife, 15 de Maio de 2009

1º Examinador:


Rita de Cássia de Moura
Depto. de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas (UPE)

2º Examinador:


Profª Dra. Vilma Loreto da Silva
Depto. de Genética (UFPE)

3º Examinador:


Profª Dra. Rosilda dos Santos Silva
Depto. de Genética (UFPE)

Coordenador:


Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

*A maior felicidade da vida é a convicção de sermos amados, pelo que somos, ou, mais
que isso, apesar do que somos.*

Victor Hugo

*Se pudéssemos encher de tinta os oceanos,
Se os céus fossem um vasto pergaminho,
Se cada haste fosse uma pena,
E todo homem, um escritor,
Escrever sobre o amor de Deus
Faria secar os oceanos,
Nem poderia esse pergaminho contê-lo todo,
Embora esticado de horizonte a horizonte.*

Autor Desconhecido

Dedico...
Às minhas heroínas: mamãe e vovó;
Ao meu vovô: sua amada memória nunca será esquecida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. “Por tudo que tens feito, por tudo que vais fazer. Por tuas promessas e tudo que és, eu quero te agradecer de todo meu ser. Te agradeço meu SENHOR”. Obrigada pelos momentos alegres, assim como pelas tormentas que me ajudaste a superar. Obrigada por que em ti meus propósitos não podem ser frustrados, pois “em todas as coisas somos mais que vencedores por aquele que nos amou” (Rm 8:37). Obrigada por que as muitas águas não podem apagar o teu amor por mim, e este amor é hoje a razão da minha vitória. Muitos te chamam de acaso, coincidência, destino. Eu te chamo AUTOR DA VIDA e agradeço por tua assinatura em minha existência.

A minha família, pelo apoio incondicional, por serem os alicerces de minha vida. À minha super mãe pelo milagre de tê-la em minha vida, por ser amiga e companheira em todos os momentos. Pelos incontáveis sacrifícios e batalhas em prol da minha educação e felicidade. Você é meu maior orgulho e espero nunca decepcioná-la. EU TE AMO mainha. À minha amada vovó, minha mulher-maravilha, meu maior exemplo de perseverança, garra e coragem. Pelo carinho e apoio desmedidos durante todos esses anos. Por ser a prova viva de que a sabedoria e o amor não são páreos ao maior grau acadêmico que se possa ser alcançado. À meu tio Jai, por ser amigo, incentivador e o tio-pai que toda sobrinha quer ter. À minha tia Marly pelo cuidado, motivação, por sempre acreditar em meu potencial e por suas palavras de incentivo e carinho. Enfim, a toda minha família que sempre torceu por mim, se alegrou com minhas conquistas e esteve comigo nos altos e baixos.

Ao meu amado namorado, Thiago, pelo apoio por todo esse período. Por compreender os momentos em que precisei estar menos presente e incentivar meu crescimento profissional e acadêmico. Estar ao seu lado me faz muito bem, te amo!

A Prof^a. Neide pelo exemplo acadêmico e pela confiança em mim depositada. Você soube destacar minhas qualidades e apontar meus defeitos sempre de forma humana e cuidadosa. Destacou sempre a importância da humildade e de acreditar no nosso potencial, você é o exemplo do verdadeiro MESTRE. Obrigada por tudo!

A Dr^a. Terezinha pelo carinho e incentivo, sua disponibilidade e boa vontade em tudo que precisei. Pela preocupação em passar e oferecer o melhor ao seu alcance e pelo exemplo de dedicação àqueles que são o motivo maior de nosso projeto, os pacientes. Muito obrigada!

A Dr^a. Luiza pela confiança e colaboração, por ter aceitado me co-orientar e acreditar no nosso projeto. Pelo entusiasmo contagiante e pela vontade de realizar sempre o melhor. Obrigada!

A Eliane pela amizade e exemplo profissional. Por tudo que me ensinou e apoiou. Pela imensa capacidade e pelo dom de compartilhá-la humildemente. Por seu exemplo força, coragem e altruísmo. Apesar de pequenina seu coração é um gigante. Obrigada por fazer parte de mais uma etapa de minha vida.

A Prof^a. Teresa Marquim pela amizade e carinho a mim dispensados. Pelos conselhos e por estar sempre disposta a ajudar. Pelo espírito sempre alegre e otimista que a todos contagia. Obrigada!

A Prof^a. Tereza Cartaxo por se colocar a disposição sempre que precisei e por ajudar desde a produção inicial do projeto até o final da escrita, com sugestões e correções sempre pertinentes. Muito obrigada!

A Maíra Mafra pela paciência e boa vontade em ensinar a acompanhar todos os procedimentos de biologia molecular deste trabalho. Sem você eu estaria perdida, obrigada de coração!

A Amanda por ter me ajudado nesta etapa final, mas não menos importante, por ter sido sempre solícita e pontual.

Aos médicos do CEON pelo apoio sempre dispensado e por fazerem seu magnífico trabalho doando esperança e amor às crianças e seus familiares na árdua trajetória enfrentada por estes contra esta doença.

Aos pacientes e seus familiares por permitirem que este estudo fosse realizado.

Ao Hospital Osvaldo Cruz e ao GAC (Grupo de Apoio à Criança com Câncer) pela infraestrutura e disponibilidade de recursos e aos órgãos de fomento (UFPE, CNPq e FACEPE), pela bolsa CNPq e pelo apoio financeiro para a realização dos procedimentos necessários a este estudo.

Aos colegas de laboratório Jemima, Marina, Dr^a. Luci e Amália, pela amizade, convívio e por todas as experiências trocadas. Aos colegas dos laboratórios de Biologia Molecular e Imunofenotipagem, pela convivência harmoniosa e agradável.

Aos meus amigos, eternos companheiros, confidentes e cúmplices. Àqueles que tive a felicidade de encontrar aqui em Recife e que constituem hoje minha segunda família: Às meninas (Henny, Bê, Lígia Zéfa, Maíra e Narji) e Djalma pelos anos de estudos e amizade, pelo apoio incondicional, por fazerem minha permanência aqui longe de minha família muito menos dolorida, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem, por aturarem meus excessos de humor ou chatice e por adorarem explorar meus dotes culinários. À Thatiana pela amizade sincera e leal, por ter me acolhido no momento que eu mais precisei. Pela disposição em ajudar em todos os aspectos possíveis e pelas longas conversas madrugada adentro. Obrigada estressadinha, te adoro!!

Aos amigos que deixei em minha terra natal (Salvador) e que fazem essa distância parecerem poucos passos, especialmente à Nanda pelos mais de dez anos de amizade fiel, pelas sessões de cinema e junk-food, pelas gargalhadas e por ser incondicionalmente minha amiga-mais-que-irmã.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas	IX
Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas	XIII
Resumo	XIV
Abstract	XV
1. Introdução	01
2. Revisão da Literatura	03
2.1 Origem do Câncer	03
2.2 Características Gerais da Leucemia	03
2.3 Classificações da Leucemia Mielóide Aguda	05
2.4 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)	08
2.4.1 Um Breve Histórico da Leucemia Promielocítica Aguda	09
2.5 Patogênese Molecular da Leucemia Promielocítica Aguda	11
2.5.1 As Funções do RAR α	17
2.5.2 As Funções dos Parceiros do RAR α	21
2.6 A Importância do Diagnóstico Genético da Leucemia Promielocítica Aguda	24
2.6.1 Análise Citogenética	26
2.6.2 FISH: Vantagens e Desvantagens	27
2.6.3 A RT-PCR no Diagnóstico Molecular da Leucemia Promielocítica Aguda	28
2.6.4 O Papel da Imunofluorescência	30
2.7 Os Fatores Prognósticos na Leucemia Promielocítica Aguda	32
3. Referências Bibliográficas	34
4. Manuscrito de Artigo Científico	45
5. Conclusões	65
6. Anexos	66
6.1 Guide for Authors – Cancer Genetics and Cytogenetics	67
6.2 As Funções dos Parceiros do RAR α (continuação)	70
6.3 Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – HUOC.	76
6.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	77

Lista de abreviaturas

Ara-C	<i>Cytosine Arabinoside</i> ou <i>Cytarabine</i> – Citrabina
ATO	<i>Arsenic Trioxide</i> – Trióxido de Arsênico
ATRA	<i>All-trans Retinoic Acid</i> – Ácido Trans-retinóico
add	Adição
CD56	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> – Molécula de Adesão de Células Neurais
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
DAPI	4,6-Diamino-2-Fenilindol
del	Deleção
der	Cromossomo derivativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
EWP	<i>European Working Party</i>
FAB	<i>French-American-British Classification</i> – Classificação Franco-americana-britânica
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> – Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
HDAC	<i>Histone Deacetylase Complex</i> – Complexo de Histonas Desacetilases
i	Isocromossomo
ins	Inserção
inv	Inversão cromossômica
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
mar	Cromossomo marcador
<i>NPM/NPM</i>	<i>Nucleophosmin Gene</i> – Proteína NPM
<i>NuMA/NuMA</i>	<i>Nuclear-mitotic Apparatus Protein</i> – Proteína NuMA
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Braço curto
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reação da Polimerase em Cadeia
<i>PML/PML</i>	<i>Promyelocytic Leukemia Gene</i> / Proteína PML
<i>PLZF/PLZF</i>	<i>Promyelocytic Leukemia Zinc Finger</i> / Proteína PLZF
q	Braço longo
RA	<i>Retinoic Acid</i> – Ácido Retinóico
<i>RARα/RARα</i>	<i>Retinoic Acid Receptor Alpha Gene</i> / Proteína RARα
RARβ	<i>Retinoic Acid Receptor Beta</i>
RARγ	<i>Retinoic Acid Receptor Gama</i>

RAREs	<i>Retinoic Acid Response Elements</i> – Elementos de Resposta ao Ácido Retinóico
RAR	<i>Retinoic Acid Receptors</i> – Receptores do Ácido Retinóico
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico
RQ-PCR	' <i>Real-Time</i> ' ou <i>Quantitative</i> RT-PCR
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i> – Receptores X Retinóides
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SMD	Síndrome Mielodisplásica
<i>STAT5b</i> /STAT5b	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5B Gene</i> – Proteína STAT5b
t	Translocação cromossômica
WBC	<i>White Blood Cell Count</i>
(-) sinal negativo	Perda de material genético
(+) sinal positivo	Ganho de material genético
[N°], n° entre []	Representa o número de células com determinada alteração
(,) vírgula	Separa n° de cromossomos, cromossomos sexuais e anormalidades cromossômicas
(;) ponto e vírgula	Separa cromossomos e regiões cromossômicas quando os rearranjos estruturais envolvem mais de um cromossomo
(/) barra inclinada	Separa os clones de um cariótipo
(?) interrogação	Identificação questionável de cromossomo ou estrutura cromossômica

Lista de Figuras

Revisão da Literatura

- Figura 1** - Características clínicas da LPA. Principais manifestações clínicas da LPA: acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea (A) e sangue periférico (B), e a severa tendência a hemorragias devido aos baixos níveis de fibrinogênio e ao fenômeno da coagulação intravascular disseminada (C e D). 08
- Figura 2:** Desenho esquemático da citogenética e estrutura molecular do rearranjo $t(15;17)(q22;q12)$. Os cromossomos normais (CN) 15 e 17 (#15 e #17, respectivamente), e os cromossomos derivativos na LPA com $t(15;17)$ (LPA) são mostrados esquematicamente, assim como os loci dos genes *PML* e *RAR α* e das fusões *PML-RAR α* e *RAR α -PML*. As setas vermelhas apontam os pontos de quebras nos cromossomos normais. 12
- Figura 3:** Lesões moleculares ocultas detectadas em casos de LPA caracterizadas morfologicamente com análise citogenética bem sucedida. As frequências dos subgrupos citogenéticos e moleculares estão baseadas no estudo de 611 casos de LPA do European Working Party (EWP). 16
- Figura 4:** Desenho esquemático da proteína *RAR α* e proteínas quiméricas X-*RAR α* . 17
- Figura 5:** Via metabólica do retinol. 19
- Figura 6:** Ativação transcricional modulada pela proteína *RAR α* selvagem e pelas proteínas quiméricas *PML-RAR α* e *PLZF-RAR α* . (A) o heterodímero RXR:*RAR α* (desligado) reprime a transcrição gênica através do recrutamento de um complexo repressor formado por N-CoR, SMRT, HDAC e outros co-repressores, desencadeando a desacetilação histônica. Ao ocorrer a ligação do ATRA, o heterodímero RXR:*RAR α* (ligado) libera o complexo repressor e liga-se a um complexo ativador com atividade de histona acetilase (HAT), resultando em ativação transcricional. (B) Semelhantemente aos receptores selvagens, a proteína quimérica *PML-RAR α* interage com o complexo repressor. No entanto, doses fisiológicas do ATRA não promovem o desligamento das proteínas repressoras. Apenas na presença de altas doses de ATRA os co-repressores são substituídos por co-ativadores que permitem a ativação da transcrição. (C) A proteína *PLZF-RAR α* , por sua vez, não responde às altas doses do ATRA devido à presença de um sítio de ligação aos co-repressores na porção da PLZF que permanece na proteína fusionada (Mistry et al., 2003). 20
- Figura 7:** Representação esquemática dos três principais transcritos quiméricos *PML-RAR α* . O ponto de quebra do gene *RAR α* ocorre sempre no íntron 2. Devido às diferentes quebras do gene *PML* (íntron 6, éxon 6 e íntron 3), diferentes segmentos deste gene se fusionam ao éxon 3 do *RAR α* , produzindo os transcritos (isoformas) bcr1 (L), bcr2 (V) e bcr3 (S), respectivamente. Os números representam os éxons dos genes *PML* e *RAR α* . 29

Manuscrito de Artigo Científico

Figura 1: Cariótipo por bandeamento G (paciente 15) apresentando a t(15;17). 60

Figura 2: Análise pela FISH. Esquema da visualização da técnica de FISH em núcleos interfásicos; (A) célula normal, (B) célula com o rearranjo *PML/RARα*. Análise dos pacientes; (a) núcleo positivo para fusão *PML/RARα* (paciente 02), (b) núcleo positivo para fusão *PML/RARα* com sinal extra para região do gene *PML* (paciente 06), (c) núcleo negativo para t(15;17), porém com cópia extra da região do gene *PML* (paciente 04). 60

Figura 3: Imunofluorescência Indireta anti-PML (paciente 05) apresentando padrão microgranular determinando a presença da t(15;17). Setas apontam as células blásticas. 61

Lista de Tabelas

Revisão da Literatura

Tabela 1: Classificação das LMAs: FAB e OMS.	07
Tabela 2: Frequência e caracteres clínicos dos cinco subtipos da LPA.	11
Tabela 3: Comparação entre as proteínas de fusão parceiras do RAR α .	23
Tabela 4: Métodos para o diagnóstico genético da Leucemia Promielocítica Aguda.	25
Tabela 5: Fatores prognósticos na Leucemia Promielocítica Aguda.	32

Manuscrito de Artigo Científico

Tabela 1: Resultados das análises por citogenética clássica e molecular (FISH), biologia molecular (RT-PCR), imunofluorescência (PG-M3).	59
---	----

Resumo

A leucemia promielocítica aguda (LPA) corresponde a cerca de 20-28% das LMAs nos países latino-americanos, sendo caracterizada pelo acúmulo de células leucêmicas na medula óssea semelhantes a promielócitos e clinicamente associada à coagulopatia, que é responsável pela alta mortalidade precoce nas fases iniciais de tratamento. Apesar da LPA ser geralmente reconhecida por seus caracteres morfológicos, existem casos atípicos. A LPA é uma patologia beneficiada pelo tratamento com ATRA e, portanto, um rápido e eficiente diagnóstico é essencial. A citogenética em geral e a RT-PCR são amplamente utilizadas na detecção da fusão gênica *PML-RAR α* . Estas técnicas fornecem informações adicionais sobre a presença de outras anormalidades citogenéticas, porém consomem tempo e requerem laboratórios especializados. O padrão da PML provou-se útil ao diagnóstico da LPA clássica através de técnicas imunológicas utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais. Neste estudo foram analisados 15 pacientes, de ambos os sexos, idade variando de 4 a 17 anos, diagnosticados com LPA no Centro de Oncohematologia Pediátrica do HUOC ou Instituto Nacional do Câncer entre os anos de 2004 a 2008. As amostras de medula óssea dos pacientes foram tratadas de acordo com protocolos padrões sendo realizadas as técnicas de bandeamento G, RT-PCR, FISH usando sonda para o rearranjo *PML-RAR α* e imunofluorescência com anticorpo monoclonal PG-M3. A análise por bandeamento G revelou alterações cromossômicas, com excessão de dois casos que apresentaram cariótipos normais. O estudo apresentou: um cariótipo complexo 47,XX,del(12p),add(14q),del(15q),i(19q),+mar, onde não foi detectada a fusão *PML-RAR α* pela RT-PCR, nem pela FISH; um 48,XX,+2mar, no qual também não foi detectada a fusão *PML-RAR α* pelas técnicas moleculares. Estes dois casos podem conter fusões variantes. Sete casos com t(15;17) foram detectados pela citogenética e confirmados pela FISH; cinco casos com t(15;17) confirmados pela FISH quando não foi possível realizar a análise citogenética. Em três casos a RT-PCR mostrou-se divergente da FISH. A imunofluorescência foi realizada em cinco casos e todos confirmaram o diagnóstico da LPA clássica. Sete pacientes estão vivos, seis em remissão, um em tratamento e oito foram a óbito. Estes dados mostram a importância da união de diversas metodologias para o aperfeiçoamento da eficiência e sensibilidade do diagnóstico e do tratamento desta doença.

Palavras-chaves: Leucemia promielocítica aguda (LPA), Diagnóstico genético, Bandeamento G, Anticorpo Anti-PML (PG-M3)

Abstract

The acute promyelocytic leukemia (APL) accounts for 20-28% of all AML in Latin-Americans' countries, it have been characterized by a block in differentiation of hematopoietic cells at the promyelocytic stage of development and it is clinically associated with coagulopathy, which is responsible for high rate of early mortality. Although APL generally is recognized by its characteristic morphologic features, there are atypical cases. The APL is a pathology that benefits from treatment with ATRA and for which a rapid and accurate diagnosis is essential. Cytogenetics in general and RT-PCR are used widely for the detection of the *PML-RAR α* fusion gene. These techniques provide additional information about the presence of other cytogenetic abnormalities, but they are time consuming and require specialized laboratories. The PML pattern has proved useful for the diagnosis of classic APL by standard immunologic techniques using monoclonal or polyclonal antibodies. In this study were analyzed 15 patients, both sex, with an age variation between 4 and 17 years old, diagnosed with APL from Pediatric Oncohematology Center of HUOC or National Cancer Institute between 2004 and 2008. The patient's samples of bone marrow were treated according standard protocols and were performed the techniques of G banding, RT-PCR, FISH using *PML-RAR α* probe and immunofluorescence with PG-M3 antibody. The G banding analyzes reveal chromosomal alterations except for two cases that presented normal karyotypes. The study showed: a complex karyotype 47,XX,del(12p),add(14q),del(15q),i(19q),+mar, that was not detected by RT-PCR the *PML-RAR α* fusion, neither FISH; one 48,XX,+2mar, in which wasn't detected *PML-RAR α* fusion in both molecular techniques. These cases could contain a variant fusion. Seven with t(15;17) detected by cytogenetic and confirmed by FISH; five with t(15;17) confirmed by FISH when cytogenetic analyzes wasn't possible. In three cases RT-PCR showed divergence with FISH. In five cases immunofluorescence was performed and all confirmed the classic APL diagnoses. Seven patients are alive, six in remission and one in treatment, and eight are deceased. This finding shows the importance of joining several methodologies for improving the diagnoses accuracy and sensibility and the treatment of this disease.

Key words: Acute promyelocytic leukemia (APL), Genetic diagnoses, G banding, Anti-PML antibody (PG-M3).

1. Introdução

A leucemia promielocítica aguda (LPA) corresponde a cerca de 20-28% das leucemias mielóide agudas (LMAs) nos países latino americanos e caracteriza-se pela expansão clonal de promielócitos anormais, sendo classificada pelo grupo franco-americano-britânico (FAB) como LMA-M3, podendo ocorrer em qualquer faixa etária. Os pacientes com este tipo de leucemia frequentemente desenvolvem coagulopatia e podem evoluir rapidamente ao óbito por ocorrências hemorrágicas. No entanto, o uso do ácido transretinóico (ATRA) associado à quimioterapia tem contribuído para a boa resposta clínica destes pacientes, sendo a LPA considerada uma das leucemias com melhor prognóstico.

Esta doença é geneticamente caracterizada pela translocação recíproca $t(15;17)(q22;q12)$, resultando numa nova proteína de fusão (PML-RAR α), responsável pela inibição da diferenciação normal de células mielóides e promovendo sua sobrevivência. Aproximadamente 90% dos casos de LPA apresentam esta translocação.

O diagnóstico genético da LPA passou a ser considerado um dos métodos mais confiáveis para a fiel identificação dos casos desta doença na atualidade. A análise citogenética convencional vem sendo utilizada para a confirmação do diagnóstico morfológico desta doença. Embora o achado citogenético da $t(15;17)$ não seja encontrado em outros tipos de leucemia, é fato a ocorrência de “falsos negativos” devido, principalmente, a rearranjos crípticos desta translocação que ocultam a visualização deste evento. Desta forma, a combinação de vários métodos é essencial para a avaliação completa do cariótipo. A união de técnicas da citogenética clássica e molecular e de biologia molecular, tais como FISH e PCR aumentam a sensibilidade do diagnóstico e monitoramento da doença. A análise por imunofluorescência para detecção do padrão nuclear microparticulado de coloração da proteína PML resultante da fusão *PML-RAR α* , usando anticorpos anti-PML monoclonal (PG-M3), também vem sendo utilizada por ser uma técnica rápida, sensível e de baixo custo comparada às técnicas moleculares como FISH e PCR.

As LMAs correspondem a 20% das leucemias agudas em crianças, no entanto este grupo de doenças é muito pouco estudado, sendo este fato ainda mais evidente em nosso país. A estimativa para o biênio 2008/09 feita pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA/RJ/Brasil) informa que ocorrerão cerca de 9.890 novos casos de câncer por ano em crianças e adolescentes com até 18 anos de idade. Em países em desenvolvimento, o câncer pediátrico atualmente se destaca como principal causa de óbito. No Brasil, em 2005, a taxa de mortalidade por câncer em pacientes de 1 a 19 anos foi de 8% em relação a todos os óbitos, configurando a segunda colocação dentre as causas de morte em crianças e adolescentes. Este dado traz grandes e novos

desafios à gerência das questões que cercam a atenção oncológica, principalmente por parte do Sistema Único de Saúde (SUS).

Desta forma, a finalidade deste trabalho é relacionar os dados citogenéticos clássicos/moleculares, de biologia molecular e a detecção imunológica da proteína PML com o objetivo de auxiliar o diagnóstico e o estabelecimento do prognóstico, bem como subsidiar novas condutas terapêuticas e preventivas de recaída nos pacientes atendidos nas diferentes instituições que farão parte deste projeto, além de contribuir para a geração de conhecimento quanto ao estudo cromossômico das leucemias em nossa população.

2. Revisão da Literatura

2.1 Origem do Câncer

Atualmente, o câncer é considerado como uma doença genética de células somáticas e seu desenvolvimento é determinado pelo acúmulo simultâneo de mutações no DNA da célula. A perda do controle sobre o número de células devido a estas alterações promove falhas nos mecanismos de controle, os quais mantêm o equilíbrio dos processos celulares de crescimento e diferenciação. Afirma-se assim uma vantagem proliferativa para as células cancerígenas em detrimento das demais células do órgão (Petrilli e Toledo, 2001).

2.2 Características Gerais da Leucemia

A leucemia é uma neoplasia maligna originada de uma célula hematopoética multipotente, caracterizada pela proliferação anárquica e clonal de blastos anormais na medula óssea (Caligiuri e Bloomfield, 2001). Ela resulta da ocorrência de múltiplas etapas nas quais mutações de múltiplos genes acontecem nas células precursoras do espaço medular. O primeiro evento (mutação) leva a uma hematopoese clonal e este estágio é geralmente marcado por microcitose eritrocitária e leve citopenia. O desenvolvimento de citopenia profunda e displasia em uma ou mais linhagens celulares pontuam o segundo estágio da evidente displasia. Nesta etapa são muito comuns alterações clonais e tais anormalidades são usualmente associadas à perda de genes supressores de tumor. No último estágio é evidenciado o bloqueio da diferenciação (parada maturativa), um aumento da população blástica na medula e a leucemia propriamente dita. Anormalidades cromossomais adicionais costumam ocorrer levando a alterações cromossômicas complexas nesta etapa (Witte *et al.*, 2002).

A classificação das leucoses é baseada em critérios, como o tipo celular envolvido, o grau de diferenciação e a evolução clínica seguida na doença. Nas leucoses crônicas há um aumento de células neoplásicas maduras não funcionais que substituem paulatinamente os elementos normais da medula óssea, enquanto que nas leucoses agudas acontece a proliferação de elementos celulares imaturos e de rápida evolução clínica. Os sinais e sintomas clínicos mais comuns decorrentes da leucemia são: palidez, fadiga e fraqueza conseqüentes à anemia devido à escassez eritrocitária, sangramento (equimoses, petéquias, hemorragias) secundário a plaquetopenia, febre e infecções

recorrentes, refletidas pela deficiente função fagocitária secundária ao comprometimento do setor granulocítico (Rapaport, 1990).

As leucemias agudas abrangem um grupo bem heterogêneo de enfermidades malignas das células precursoras hematopoéticas. A proliferação clonal destes precursores que perderam a capacidade de se diferenciar leva ao acúmulo excessivo de blastos leucêmicos na medula óssea, ocasionando a síndrome da imunodeficiência medular e a infiltração de diversos tecidos do organismo (Gilliand *et al.*, 2004).

As leucemias agudas são divididas em linfóides e mielóides e diferem em seus aspectos clínicos, assim como no curso da doença e resposta ao tratamento. Essa diferenciação entre leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA) é essencial às intervenções terapêuticas. A subclassificação em grupos é também fundamental, uma vez que o tratamento envolve grupos genéticos específicos (Head, 2004).

A LMA engloba um grupo de doenças clonais clínicamente e molecularmente heterogênea caracterizada pelo acúmulo excessivo de células progenitoras mielóides que perderam a capacidade de se diferenciar, comprometendo, este setor do sistema hematopoético (Mayani, 1996). A LMA pode apresentar-se como uma doença *de novo* ou pode ser secundária à crise blástica de LMC, evolução de mielodisplasia e a tratamentos que utilizam agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase e/ou radiação ionizante (Rund *et al.*, 2004).

A incidência da LMA é em torno de 1/100.000 por ano na população abaixo dos 30 anos e alcança 10-12/100.000 por ano nos indivíduos acima dos 60 anos, representando 80% dos casos de leucemia aguda nos adultos e 15-20% na infância, além de ser a leucemia mais freqüente em recém nascidos (Lichtman e Liesveld, 2001). Infelizmente, o curso clínico natural deste diversificado grupo de neoplasias é fatal em termos de dias, semanas ou meses a partir do diagnóstico. Isto se deve, principalmente, às complicações advindas da insuficiência medular, podendo ser citadas como as mais comuns: infecções ligadas à neutropenia e hemorragias relacionadas à trombocitopenia. Apesar da clínica comum entre si, as características hematológicas e prognósticas destas doenças são distintas e, portanto, sugerem possuir diferentes trajetórias patogênicas (Clarke e Glaser, 2000).

Virtualmente todas as LMAs são fruto de um clone de células que carregam defeitos em seu DNA, os quais desencadeiam erros nos mecanismos de sinalização celular que controlam os processos de proliferação e diferenciação nas células

mielóides. Estes defeitos genéticos podem ser resultado de diversos eventos mutationais possíveis, tais como deleções cromossômicas, translocações, mutações pontuais, entre outras (Rowley, 1999). Nas últimas décadas, um imenso progresso foi conquistado na caracterização de leucemias e alterações genéticas que podem ser identificadas na maioria dos casos de LMA. Porém, ainda existem casos onde nenhuma alteração é caracterizada e a razão disto é possivelmente a falta de conhecimento. Portanto, acredita-se que a resolução deste impasse é apenas uma questão de tempo e estudo, e então serão identificados erros genéticos em todos os casos de LMA (Cucuianu, 2005).

2.3 Classificações da Leucemia Mielóide Aguda

Objetivando a padronização dos tipos celulares presentes nas leucemias agudas foram criadas as classificações morfológicas e imunofenotípicas. A classificação morfológica foi criada por um grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos, conhecida também como classificação FAB (Tabela 1), possuindo oito subtipos principais, M0 a M7 e algumas variantes, os quais apresentam caracteres particulares. Atualmente a classificação FAB se baseia nos aspectos morfológicos das células predominantes nos esfregaços de medula óssea e/ou sangue periférico analisados dos pacientes, e nas características citoquímicas, de imunofenotipagem e citogenéticas destas células. A seguir serão destacadas as características de cada subtipo de acordo com o tipo celular predominante (Bennett, 1985a,b).

O subtipo FAB M0, LMA sem diferenciação, apresenta blastos muito indiferenciados, desprovidos de marcadores citológicos e imunocitoquímicos definitivos de mieloblastos, mas expressam pelo menos um antígeno de linhagem mielóide (CD13, CD33). Os blastos são pequenos e agranulares com cromatina frouxa, nucléolo evidente e assemelham-se a mieloblastos do ponto de vista ultraestrutural. Este subtipo é raro e representa apenas 2% dos casos de LMA.

A LMA minimamente diferenciada, subtipo FAB M1, apresenta elevada percentagem de blastos indiferenciados (>30%) na contagem diferencial do mielograma com pouca diferenciação para mieloblasto. Neste subtipo, os bastonetes de Auer são ocasionalmente visualizados. A LMA M1 representa cerca de 20% dos casos. Por outro lado, o subtipo M2, LMA com diferenciação granulocítica, representa cerca de 30% dos casos e é caracterizado pela presença da série de maturação até pró-mielócitos (< 20% de monoblastos) com bastonetes de Auer proeminentes.

A leucemia promielocítica aguda (LPA), subtipo M3, apresenta prevalência de promielócitos anormais hipergranulares onde se observa muitos bastonetes de Auer por célula, núcleo geralmente bilobulado ou reniforme. Sua incidência varia de 5% a 19% dos casos da doença. Os pacientes com este tipo de leucemia frequentemente desenvolvem coagulopatia (coagulação intravascular disseminada, fibrinólise e proteólise). A M3v (M3 variante) se caracteriza pela presença de granulações finas, núcleo com profundas fendas e pequeno número de bastonetes de Auer.

O subtipo FAB M4 conhecido como leucemia mielomonocítica aguda, comum em 15-20% das LMAs, apresenta tanto diferenciação mielocítica como monocítica sendo que 20% a 80% das células não-eritróides são compostas de monoblastos. A variante M4Eo está associada à presença de >5% de precursores eosinofílicos displásicos na medula óssea.

O subtipo FAB M5, leucemia monocítica aguda, caracteriza-se por apresentar pelo menos 80% de células monoblásticas grandes com citoplasma abundante contendo granulações finas, são raros os bastonetes de Auer, de núcleo convoluto e cromatina frouxa, podendo conter grandes nucléolos. Pode também apresentar promonócitos e monócitos. Ocorre em aproximadamente 10% das LMAs. Este subtipo abrange as variantes M5a e M5b. No subtipo M5a ocorre o predomínio de monoblastos sem diferenciação, células grandes com citoplasma livre de granulações e núcleo de cromatina frouxa, representando mais de 80% dos componentes celulares não-eritróides. Enquanto a M5b apresenta mais de 80% de células de linhagem monocitária (monoblastos, promonócitos e monócitos), demonstrando diferenciação.

A eritroleucemia aguda, FAB M6, é pouco freqüente, representando apenas de 2-5% dos casos de LMA. Nesta leucemia eritroblastos anormais são numerosos na medula e muitas vezes no sangue. Algumas destas células são megaloblastóides ou possuem núcleos gigantes e/ou múltiplos. Mieloblastos também estão presentes em pelo menos 30%.

O subtipo FAB M7, leucemia megacarioblástica aguda, também é raro e é caracterizado pela ocorrência de megacarioblastos com fibrose medular associada. Apresenta blastos pequenos com citoplasma pálido agranular e com protrusões, podendo assemelhar-se a linfoblastos. Para um diagnóstico preciso faz-se necessário um teste para peroxidase plaquetária, utilizando microscopia eletrônica ou a imunofenotipagem, através de citometria de fluxo ou imunohistoquímica.

Uma nova classificação para as neoplasias hematopoéticas e linfóides foi estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) juntamente com a Sociedade dos Hematopatologistas e a Associação de Hematopatologistas Europeus (Jaffe *et al.*, 2001). Este sistema de classificação atual é baseado não apenas nos caracteres morfológicos, mas aliados a estes inclui aspectos clínicos, biológicos, imunofenotípicos e genéticos dos pacientes para definir especificamente a patologia instalada. A introdução de informações citogenéticas e moleculares ajuda a definir mais claramente as distintas entidades envolvidas na LMA (Tabela 1) (Cucuianu, 2005). A classificação OMS incorpora e interrelaciona todas estas características tentando identificar categorias com prognósticos distintos (Rego e Falcão, 2002).

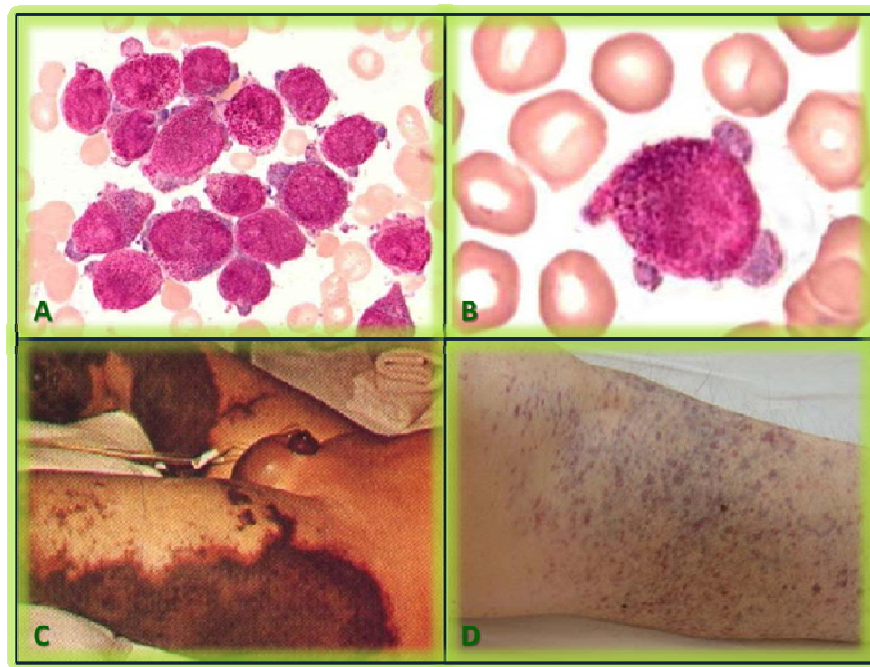
Tabela 1: Classificação das LMAs: FAB e OMS.

Classificação Francesa-Americana-Britânica (FAB) da LMA	Classificação da Organização mundial de Saúde (OMS) para a LMA
M0 - LMA sem diferenciação	LMA com anormalidades genéticas recorrentes - LMA com t(8;21) - LMA com eosinófilos anormais na medula óssea e inv(16) ou t(16;16) - Leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17) e variantes - LMA com anormalidades da 11q23
M1 - LMA minimamente diferenciada	LMA com displasia de múltiplas linhagens - Seguida de Síndrome Mielodisplásica (SMD) - Sem antecedente de SMD
M2 - LMA com diferenciação granulocítica	LMA e SMD associadas a tratamento - Associada a agentes alquilantes/radiação - Associada a inibidores de topoisomerase-II
M3 - Leucemia promielocítica aguda	LMA não categorizada nos itens anteriores
M4 - Leucemia mielomonocítica aguda	
M5 - Leucemia monocítica aguda	
M6 - Eritroleucemia aguda	
M7 - Leucemia megacarioblástica aguda	

Fonte: Modificada de Cucuianu, 2005.

2.4 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

A leucemia promielocítica aguda (LPA) ou LMA-M3, de acordo com a classificação morfológica, é caracterizada pela expansão de células leucêmicas que apresentam parada maturativa em estágio de promielócitos e não se diferenciam em granulócitos maduros, as quais se acumulam na medula óssea e sangue periférico (Fig. 1A e 1B). Neste tipo de leucemia os promielócitos anormais apresentam núcleo excêntrico e abundantes granulações no citoplasma, assim como vários bastonetes de Auer que formam feixes citoplasmáticos. Os pacientes com LPA apresentam quadro clínico e alterações laboratoriais compatíveis com coagulação intravascular disseminada¹ (CID) e podem evoluir rapidamente ao óbito, devido a fenômenos hemorrágicos (Fig. 1C e 1D) (Sagrillo *et al.*, 2005).



Fonte: Modificado de Wang e Chen, 2008.

Figura 1 - Características clínicas da LPA. Principais manifestações clínicas da LPA: acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea (A) e sangue periférico (B), e a severa tendência a hemorragias devido aos baixos níveis de fibrinogênio e ao fenômeno da coagulação intravascular disseminada (C e D).

¹ A coagulação intravascular disseminada (CID ou CVID) é uma síndrome adquirida, caracterizada pela ativação difusa da coagulação intravascular, levando à formação e deposição de fibrina na microvasculatura (Levi e Ten Cate, 1999). A deposição de fibrina pode levar à oclusão dos vasos e conseqüente comprometimento da irrigação sanguínea de diversos órgãos, que em conjunto com alterações metabólicas e hemodinâmicas, contribui para a falência de múltiplos órgãos. O consumo e conseqüente depleção dos fatores da coagulação e plaquetas, resultantes da contínua atividade procoagulante, pode levar a quadros de sangramento grave, o que freqüentemente é a primeira manifestação notada (Pintão e Franco, 2001).

A LPA pode ocorrer em qualquer faixa etária. Sua incidência é muito baixa em crianças com idade inferior a 10 anos e aumenta progressivamente durante a adolescência, alcançando seu ápice no início da fase adulta (Ribeiro e Rego, 2006). Esta leucemia representa de 5% a 10% das LMAs de acordo com dados de ocorrência em populações de países desenvolvidos. No entanto, em países latino-americanos essa incidência sobe para cerca de 20% a 25% das LMAs. Dados a respeito da epidemiologia da LPA no Brasil são escassos e baseiam-se, sobretudo, nos registros hospitalares. Recentemente um estudo realizado em 12 centros nacionais que tratam de neoplasias hematológicas fez um levantamento totalizando 157 pacientes com LPA, os quais representaram 28% dos casos de LMA (Jácomo *et al.*, 2007; 2008). A grande maioria dos casos de LPA são diagnosticados em pacientes com idade entre 20 e 50 anos, contrastando com a incidência das LMAs que em geral aumenta exponencialmente após os 55 anos. Este fato sugere que o evento mutacional inicial envolvido na gênese da doença, no caso o rearranjo da região 17q21, pode ocorrer durante o desenvolvimento hematopoético *in utero*. Esta neoplasia também foi documentada em neonatos (Ribeiro e Rego, 2006).

Embora características morfológicas dos blastos da LPA geralmente permitam o reconhecimento específico deste subtipo particular de leucemia aguda (Bennett *et al.*, 1985b), casos atípicos já foram descritos (Allford *et al.*, 1999; Lo Coco *et al.*, 1999). Por outro lado, a LPA é um tipo de leucemia que possui alta taxa de remissão ao tratamento quando o diagnóstico é rápido e eficaz, pois esse tipo leucêmico possui uma boa resposta ao tratamento com o ATRA (ácido transretinóico), que induzirá a diferenciação granulocitária dos blastos (Allford *et al.*, 1999; Lo Coco *et al.*, 1999; Villamor *et al.*, 2000; Gomis *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2005).

2.4.1 Um Breve Histórico da Leucemia Promielocítica Aguda

A leucemia promielocítica aguda (LPA) foi primeiramente descrita como uma entidade específica em 1957 por um autor sueco (Hillestad, 1957) que relatou três casos evidenciados por “um curso fatal muito rápido de apenas poucas semanas de duração”, com uma prevalência de promielócitos na contagem leucocitária e uma tendência severa a sangramentos. Neste estudo, Hillestad concluiu que essa doença “parecia ser a forma mais maligna da leucemia aguda”. Posteriormente, Bernard *et al* (1959) descreveu

características mais detalhadas da LPA, e a diátese hemorrágica² severa foi atribuída à coagulação intravascular disseminada ou hiperfibrinólise.

Até meados da década de 80 o coquetel quimioterápico usado inicialmente no tratamento da LPA era composto por alguma antraciclina e Ara-C (*cytosine arabinoside*) e as taxas de remissão completa alcançada nos pacientes recém diagnosticados variavam entre 75% e 80% (Bernard *et al*, 1973; Sanz *et al*, 1988; Cunningham *et al*, 1989). No entanto, era frequentemente notado o agravamento da síndrome hemorrágica após a quimioterapia, o que ocasionava altas taxas de óbito precoce e se fazia necessário o uso de suporte de plaquetas e fibrinogênio. Neste período apenas 35% a 45% dos pacientes alcançavam a cura com o tratamento quimioterápico pelo critério de sobrevida livre de doença por cinco anos (SLD 5-anos) (Ribeiro e Rego, 2006).

A introdução do ácido *all-trans*-retinóico (ATRA – *all-trans retinoic acid*) a partir de 1985 inaugurou uma nova etapa na história do tratamento da LPA. A otimização de protocolos de tratamento baseados na combinação do ATRA com a quimioterapia elevou a taxa de remissão completa (RC) para 90-95% e a SLD 6-anos subiu para 86% ($\pm 10\%$) em pacientes de baixo risco. Os principais genes envolvidos nesta leucemia, o gene *PML* no cromossomo 15 e o gene *RAR α* no cromossomo 17, juntamente com seus produtos anormais foram identificados em 1990 (Borrow *et al*, 1990; Longo *et al*, 1990a,b; de Thé *et al*, 1990). Ainda no início da década de 90 a introdução do uso do trióxido de arsênio (ATO - *arsenic trioxide*) melhorou os resultados minimizando os casos refratários ao tratamento e o índice de recaídas. A combinação ATRA/ATO na terapia da LPA permitiu o alcance de maior redução dos transcritos *PML/RAR α* e uma sobrevida mais longa em pacientes recém diagnosticados (Wang e Chen, 2008).

Dessa forma, a história do tratamento da LPA pode ser dividida em quatro períodos: (1) período pré-ATRA: reconhecimento da LPA como uma patologia extremamente fatal e sua resposta a quimioterapia (1957-1985); (2) introdução do ATRA na terapia de diferenciação e otimização de protocolos baseados na utilização deste (1985 até o início da década de 1990); (3) utilização do ATO no tratamento da

² Diátese hemorrágica é o nome dado a um conjunto de doenças cujo sintoma comum é a tendência à hemorragia sem causa aparente (hemorragias espontâneas) ou hemorragia mais intensa ou prolongada após um traumatismo. Pode ocorrer devido a uma anormalidade da parede vascular, plaquetas e sistemas de coagulação e fibrinólise. A hemorragia pode ocorrer na pele, nas mucosas, nas articulações, espontaneamente ou sob o efeito de causa externa (Cotran *et al*, 1996).

LPA (a partir do início da década de 1990); e (4) combinação ATRA/ATO como uma terapia sinérgica e desenvolvimento de alguns novos agentes (Wang e Chen, 2008).

2.5 Aspectos Citogenéticos e Patogênese Molecular da Leucemia Promielocítica Aguda

A LPA é geneticamente caracterizada por rearranjos cromossômicos da região 17q12, os quais promovem a fusão do gene que codifica o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα* – *retinoic acid receptor alpha*) com alguns genes “parceiros” (X) (Tabela 2) (Mistry *et al.*, 2003).

O mais freqüente dos genes parceiros é o gene da leucemia promielocítica (*PML* – *promyelocytic leukemia gene*), ocorrendo em mais de 95% dos casos. Neste rearranjo ocorre a formação de dois genes de fusão, o *PML-RARα* e seu recíproco *RARα-PML* (Grimwade *et al.*, 2000). Esta patologia é assinalada pela translocação t(15;17)(q22;q12), que gera os dois produtos quiméricos anteriormente citados (Fig. 2) (Larson *et al.*, 1984).

Tabela 2: Frequência e caracteres clínicos dos cinco subtipos da LPA.

Alteração Citogenética	Frequência na LPA	Produtos da fusão	Caracteres Clínicos
t(15;17)(q22;q21)	>95%	PML-RARα RARα-PML	Sensível ao ATRA e ao ATO
t(11;17)(q23;q21)	0,8%	PLZF-RARα RARα-PLZF	Resistente ao ATRA e ao ATO
t(11;17)(q13;q21)	Muito rara ¹	NuMA- RARα Produto recíproco não encontrado	Sensível ao ATRA
t(5;17)(q35;q21)	<0,5%	NPM-RARα RARα-NPM	Sensível ao ATRA
der(17)	Muito rara ¹	STAT5b- RARα Produto recíproco não encontrado	Sensível ao ATRA?

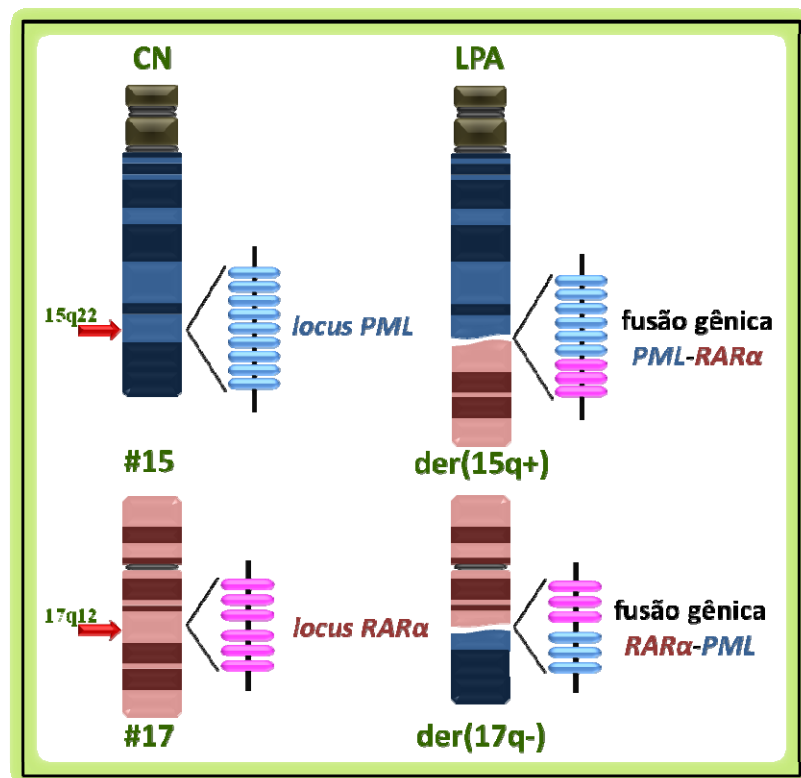
¹ apenas um caso descrito

Fonte: Mistry, 2003.

Apesar dos mecanismos de formação subjacentes desta translocação ainda não serem conhecidos, Neves *et al.* (1999) relataram que os genes *PML* e *RARα* estão localizados próximos um do outro na cromatina das células precursoras hematopoéticas em diversas fases do ciclo celular. Além disso, é conhecida a existência de pequenas

regiões de identidade entre estes dois genes nas regiões de seus pontos de quebra (Yoshida *et al.*, 1995). Estas evidências apontam para uma justificativa à forte tendência de ocorrência da t(15;17).

No entanto, uma pequena parcela dos casos de LPA surgem das translocações t(11;17)(q23;q21), t(11;17)(q13;q21), t(5;17)(q35;q21) ou ainda a partir de uma deleção intersticial no cromossomo 17 (Tabela 2), que são as chamadas translocações variantes da LPA (Chen *et al.*, 1993; Redner *et al.*, 1996; Wells *et al.*, 1997; Arnould *et al.*, 1999). Estas variações do tema clássico apresentam-se como “experimentos da natureza” onde fenótipos semelhantes são associados a diferentes genótipos (Redner, 2002).



Fonte: O Autor.

Figura 2: Desenho esquemático da citogenética e estrutura molecular do rearranjo t(15;17)(q22;q12). Observe os cromossomos normais (CN) 15 e 17 (#15 e #17, respectivamente) e os cromossomos derivados envolvidos na t(15;17) são mostrados esquematicamente, assim como os loci dos genes *PML* e *RARα* e das fusões *PML-RARα* e *RARα-PML*. As setas vermelhas apontam os pontos de quebras nos cromossomos normais.

A primeira translocação variante na LPA a ser descrita e também a mais amplamente estudada é a t(11;17)(q23;q21). Esta translocação foi primeiramente descrita por Chen *et al.* (1993) e representa 0,8% dos casos de LPA (Mistry *et al.*,

2003). A translocação t(11;17) funde o gene *PLZF* (promyelocytic leukemia zinc finger) com o *RARα* (Chen *et al.*, 1994). Assim como acontece nos rearranjos *PML-RARα* o ponto de quebra nesta translocação localiza-se no íntron 2 do *RARα* (de Thé *et al.*, 1990). Ambas as proteínas quiméricas *PML-RARα* e *PLZF-RARα* possuem os mesmos domínios B-F do gene *RARα* que codificam as regiões da proteína responsáveis pela ligação ao DNA, pela heterodimerização com os RXR e pelas funções de interação com os co-repressores e co-ativadores do *RARα* (Fig. 4C). Nesta translocação a fusão recíproca *RARα-PLZF* também é expressa (Chen *et al.*, 1994; Licht *et al.*, 1995; Grimwade *et al.*, 2000).

Apesar do fenótipo semelhante à *PML-RARα*, as leucemias com t(11;17) demonstram uma gama de caracteres morfológicos incomuns à LPA, apresentando blastos com características intermediárias entre os subtipos morfológicos M2 e M3. Em termos clínicos, a maioria dos casos com t(11;17) não respondem ao tratamento com ATRA, não sendo observada a diferenciação dos blastos expostos a este medicamento (Licht *et al.*, 1995). Estudos iniciais indicam que pacientes com t(11;17) possuem prognóstico pior que aqueles com t(15;17), falhando em alcançarem remissão seja com quimioterapia convencional ou com terapia de diferenciação com o ATRA (Fig. 6C) (Jansen e Lowenberg, 2001).

A segunda translocação variante a ser caracterizada foi a t(5;17)(q35;q21), que é também a segunda mais freqüente (Redner *et al.*, 1996). Esta variante transloca o gene da Nucleofosmina (*NPM - Nucleophosmin Gene*) que se localiza na região 5q35 para o locus do *RARα* na região 17q21 (Redner *et al.*, 1996) e representa 0,5% dos casos da LPA (Mistry *et al.*, 2003). Igualmente, o ponto de quebra ocorre no segundo intron do gene *RARα*, permitindo que uma proteína quimérica que contenha os domínios B-F do *RARα* juntamente com os domínios N-terminais do *NPM* num mesmo quadro de leitura seja expressa (Fig. 4E). A nucleofosmina é uma fosfoproteína nucleolar que participa da montagem do RNA ribossomal e apresenta atividades de chaperona³ e nuclease. Mais recentemente essa fosfoproteína foi também encontrada em associação com os centrômeros e possivelmente apresenta uma função na regulação da duplicação centromérica. A translocação recíproca *NPM-RARα* foi identificada na maioria dos

³ Chaperonas (chaperons eram garotos que ajudavam os nobres renascentistas a vestirem suas roupas complicadíssimas e colocar suas enormes perucas) constituem uma família de muitas proteínas diferentes cuja função é usar energia da hidrólise de ATP para desenovelar proteínas, possibilitando novo enovelamento, no intuito de alcançar a forma correta ou dirigir-se ao destino correto. Além disso, elas podem encaminhar a proteína à destruição, caso não seja possível atingir sua configuração correta (Fenton e Horwich, 2003; Mayer e Bukau, 2005).

casos descritos (Okuda *et al*, 2000). Semelhantemente a LPA com t(15;17), o fenótipo dos blastos encontrados na t(5;17) é compatível com M3. Estudos *in vitro* apresentaram evidências convincentes indicando que blastos que possuem a t(5;17), podem responder a diferenciação induzida pelo ATRA e em um caso avaliado, onde o paciente foi tratado com ATRA, a remissão medular foi alcançada (Redner *et al*, 1997; Hummel *et al*, 1999).

Apenas um relato da translocação t(11;17)(q13;q21) foi publicado em um lactente com seis meses de idade do sexo masculino que apresentava leucocitose e lesões na pele. Tanto o mielograma como a biopsia de pele e o esfregaço sanguíneo mostraram uma predominância de promielócitos e neutrófilos displásicos. Este paciente iniciou o tratamento com ATRA e alcançou remissão completa (Wells *et al.*, 1997). Análises por Southern blotting demonstraram o rearranjo no intron 2 do gene *RARα*, novamente o mesmo ponto de quebra da LPA com t(15;17). Posteriormente, a clonagem da região do ponto de quebra revelou que o gene co-participante nesse rearranjo era o gene *NuMA* (*Nuclear-mitotic apparatus protein*), tendo como produto final desta fusão a proteína NuMA-RARα. A translocação recíproca deste rearranjo, *RARα-NuMA*, não foi encontrada. A proteína de fusão NuMA-RARα possui 2286 aminoácidos que albergam os 1883 aminoácidos da proteína NuMA, incluindo domínios globulares N-terminais e *coiled-coil* desta, responsáveis pela reorganização nuclear, oligomerização⁴ e associação ao fuso mitótico da proteína NuMA. Unidos a isto estão os mesmos aminoácidos C-terminais que codificam os domínios B-F que são expressos nas translocações t(15;17), t(11;17), t(5;17) e der(17) (Fig. 4D) (Wells *et al.*, 1997; Redner, 2002).

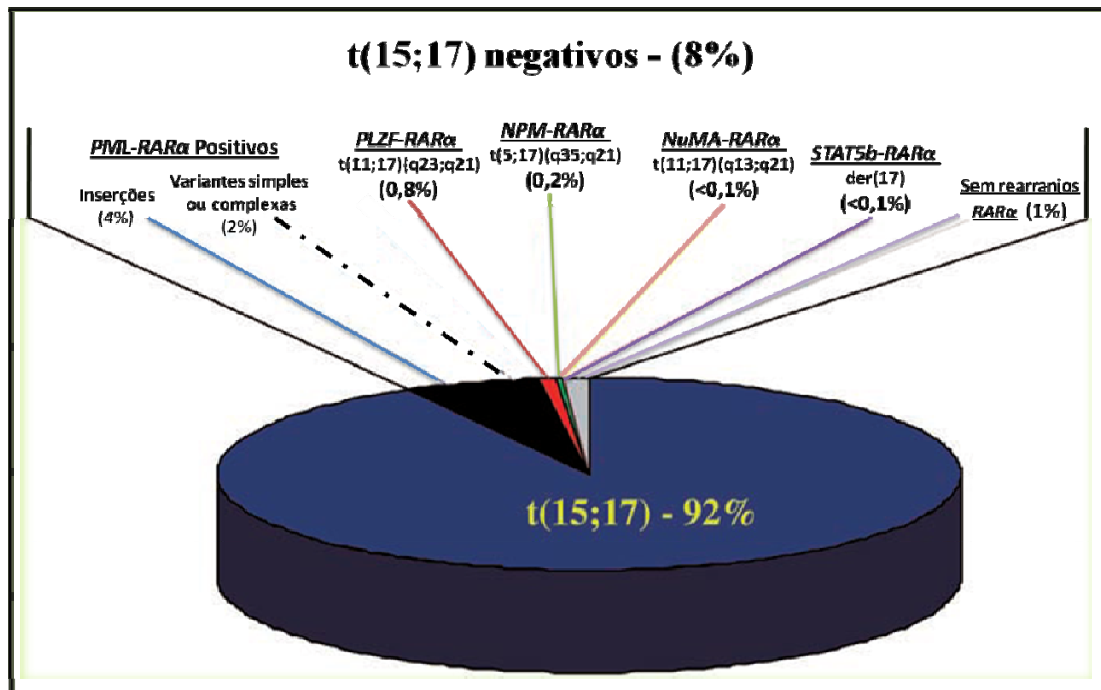
A alteração cromossômica variante der(17) também foi relatada apenas uma vez. No entanto, diferente do caso com a t(11;17)(q13;q21) que ocorreu num lactente, a alteração der(17) foi identificada em um homem com 67 anos inicialmente diagnosticado com LMA-M1. Uma pequena parte dos blastos visualizados na medula apresentou caracteres morfológicos para a variante microgranular M3v da LPA. Em estudos *in vitro* os blastos não apresentaram resposta ao ATRA. A fusão *STAT5b/RARα* ocorreu devido a uma deleção intersticial do cromossomo 17 que levou a criação de uma fusão intrônica ligando os *loci* dos genes *STAT5b* e *RARα*. Assim como o *RARα*, o gene *STAT5b* localiza-se na região 17q21.1-21.2 e estes dois genes são separados por

⁴ É o processo de conversão de um monômero (composto constituído de moléculas, cada uma das quais capazes de dar origem a uma ou mais unidades constitucionais) ou de uma mistura de monômeros em um oligômero (substância constituída de moléculas que contêm poucos átomos de uma ou mais espécies ou grupos de átomos - unidades constitucionais- ligados repetitivamente uns aos outros) (Andrade *et al.*, 2001).

aproximadamente 3Mb (Zelent *et al.*, 2001). O rearranjo do locus *RARα* foi confirmado por Southern blotting e a clonagem desta região demonstrou a presença do gene que codifica a proteína STAT5b, que pertence a uma família de transdutores de sinais e ativadores de transcrição da via de sinalização JAK (*Janus Kinase*), dentro do íntron 2 do gene *RARα*, produzindo a fusão *STAT5b/RARα*. Obviamente, devido à natureza da deleção intersticial, o produto reverso da fusão não é produzido. As seqüências N-terminais do gene *STAT5b* são fusionadas à mesma seqüência do gene *RARα* como ocorre nas outras LPAs variantes (Fig. 4F) (Arnould *et al.*, 1999; Melnick e Licht, 1999).

Muitas variantes citogenéticas foram relatadas, porém muitas destas mostraram ser compostas por rearranjos crípticos dos loci *PML* e *RARα*. De acordo com o European Working Party (EWP) a maioria dos casos onde não é possível a visualização da t(15;17) apresenta o rearranjo *PML/RARα* em análises moleculares. De fato, dentre 611 casos de LPA do EWP apenas 19 (3,1%) não apresentaram a fusão *PML/RARα*. Destes 19 casos sete demonstraram fusões do gene *RARα* com locus diferente, cinco não possuíam qualquer rearranjo envolvendo o gene *RARα* e outros sete que não foram caracterizados completamente (Fig. 3). Nenhum caso de rearranjo apenas envolvendo o gene *PML* foi encontrado, respaldando o importante papel do gene *RARα* na patogênese da LPA (Grimwade e Lo Coco, 2002).

Outras possíveis variantes da LPA que possuem rearranjos da região 17q12-q21, o locus *RARα*, foram descritas na literatura. Dentre estas estão: t(14;17)(q22;q21) (Cigudosa *et al.*, 1995), t(8;17)(p21;q21) (Miura *et al.*, 1994), t(1;17)(p36;q21) e t(7;17)(q36;q22) (Yamada *et al.*, 1983) e t(3;17)(q26.3;q12) (Silva *et al.*, 2005). No entanto, como estas fusões não foram clonadas existe a possibilidade de que algumas delas, senão todas possuam rearranjos crípticos da fusão *PML/RARα* ou das outras variantes da LPA descritas. Portanto, os dados existentes são escassos para a precisa resolução de que estes rearranjos são, de fato, novas variantes da LPA. Translocações complexas do rearranjo 15/17 também têm sido descritas, por exemplo a t(2;15;17)(q21;q22;q21) (Chen *et al.*, 1993; Redner *et al.*, 1996), bem como a ins(15;17)(q22;q12q21) (Rolston *et al.*, 2002). A deleção do cromossomo 15 pode ser um diagnóstico primário ou pode surgir durante recaída ou progressão da doença. Esta anormalidade pode ser indicada como um prognóstico muito desfavorável para a LMA sendo seguida de falecimento num período de 3 a 13 meses após o diagnóstico da doença (Berger e Coniat, 2003).

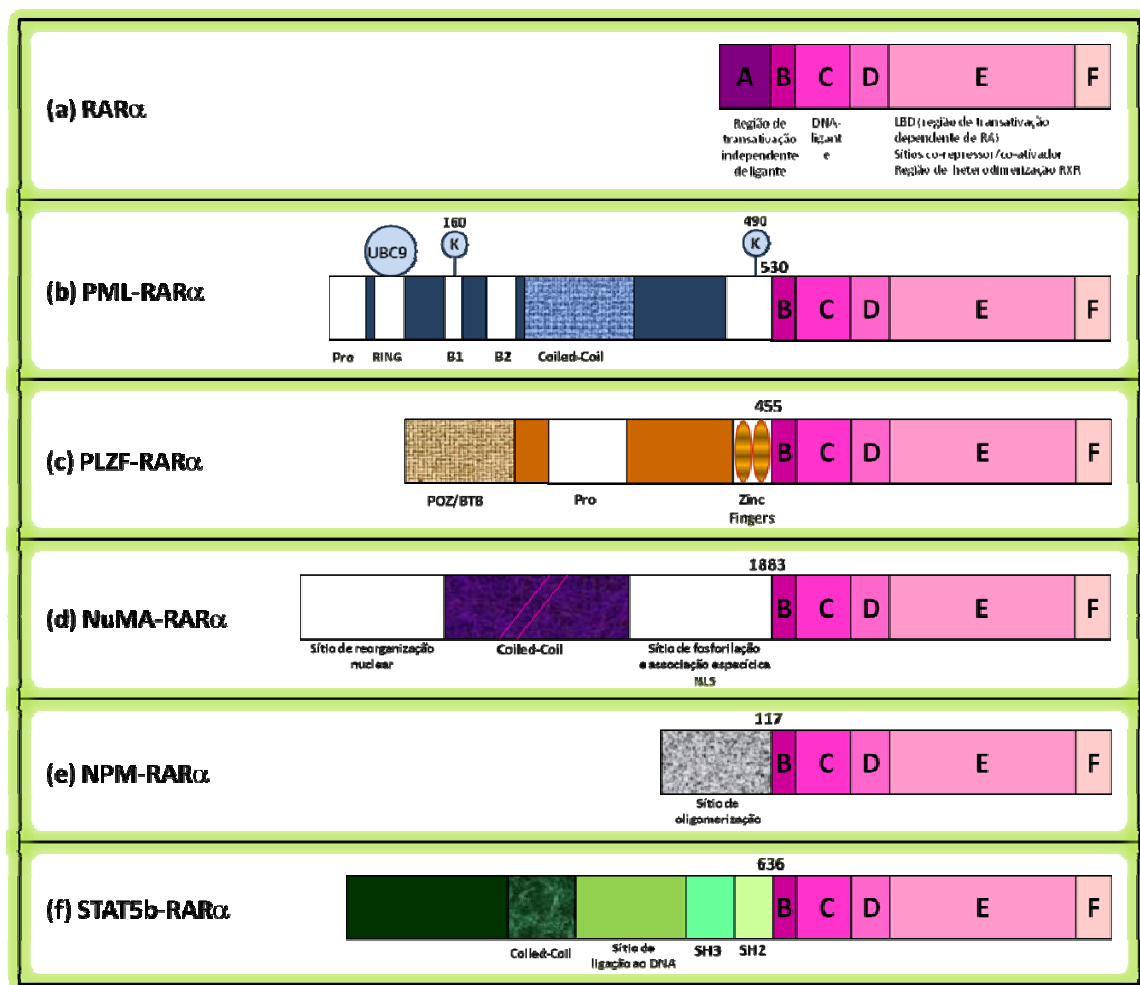


Fonte: modificada de Grimwade e Lo Coco (2002).

Figura 3: Frequência de rearranjos moleculares detectados em casos de LPA caracterizados através de análise citogenética. As frequências dos subgrupos citogenéticos e moleculares estão baseadas no estudo de 611 casos de LPA do European Working Party (EWP).

Recentemente foi possível estabelecer o papel chave representado pelas proteínas quiméricas X-RAR α (Fig. 4), na patogênese da LPA, através do recrutamento de co-repressores e do complexo de histonas desacetilases (HDAC – *histone deacetylase complex*) para reprimir os genes envolvidos na diferenciação mielóide (Mistry *et al*, 2003).

As proteínas de fusão X-RAR α possuem atributo de mediadoras da diferenciação mielóide quando administradas doses farmacológicas (supra-fisiológicas) de seu ligante, o ATRA, que é dependente da associação HDAC/complexo co-repressor (Fig. 6). A natureza do gene parceiro na fusão RAR α é um determinante crítico da resposta ao ATRA e ao Arsênico, que são as drogas de escolha no tratamento anti-LPA, enfatizando a importância da caracterização citogenética e molecular dos pacientes com esta doença para a determinação da abordagem terapêutica mais adequada (Mistry *et al*, 2003).



Fonte: Modificado de Mistry *et al.*, 2003.

Figura 4: Desenho esquemático da proteína RAR α e proteínas quiméricas X-RAR α .

2.5.1 As Funções do RAR α

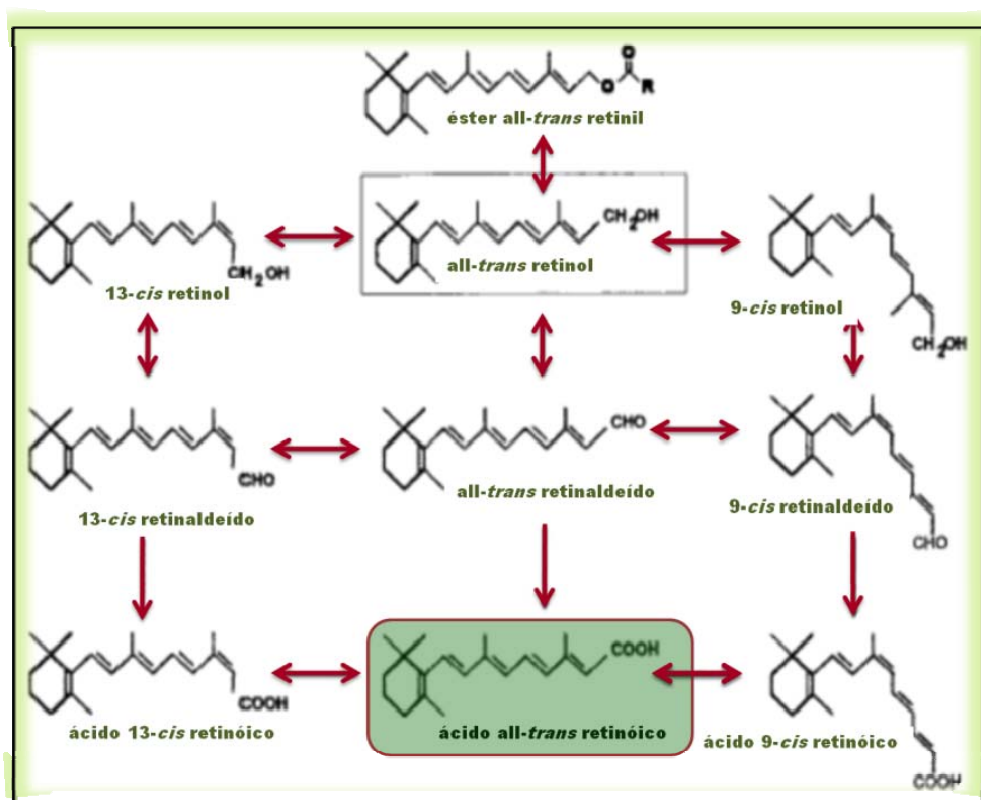
O receptor alfa do ácido retinóico (RAR α) é um membro da super-família de receptores hormonais, que atuam como reguladores transcricionais ligante-induzíveis⁵. Uma vez que o gene *RAR α* está envolvido em todos os rearranjos conhecidos da LPA, a perturbação deste gene deve contribuir de forma significativa à patogênese desta doença. Dessa forma, o conhecimento da função normal deste receptor no desenvolvimento dos neutrófilos é importante para o entendimento das prováveis funções anormais onde o receptor mutado levaria ao bloqueio da diferenciação promielocítica (Stunnenberg, 1993).

⁵ Reguladores transcricionais ligante-induzíveis são uma família de fatores de transcrição, receptores nucleares, os quais são de suma importância nos processos de crescimento celular, diferenciação, desenvolvimento e manutenção da homeostase metabólica da célula. Eles regulam a expressão genes-alvo através da ligação a sequências de DNA específicas dentro das regiões promotoras, produzindo assim os efeitos biológicos esperados (Cheng, 2005).

O RAR α se liga a elementos de resposta⁶ conhecidos como elementos de resposta ao ácido retinóico (RAREs - *retinoic acid response elements*), que se localizam nas regiões promotoras dos genes-alvo dos receptores do ácido retinóico (RAR - *retinoic acid receptors*). Os RAREs são compostos por repetições diretas de hexanucleotídeos com número variado de nucleotídeos espaçadores entre os motivos repetidos (Laudet *et al*, 1992). Os receptores do ácido retinóico necessitam formar heterodímeros com proteínas da família dos receptores de hormônios nucleares, chamados receptores X retinóides (RXRs - *retinoid X receptors*), para se ligarem com eficácia ao DNA (Leid *et al*, 1992). Estes receptores, os RARs e os RXRs, atuam na transdução do sinal retinóide e são ativados pelo ácido 9-*cis*-retinóico (9-*cis* RA - *9-cis retinoic acid*). Adicionalmente, os RARs também são ativados pelo ATRA. Tanto o ATRA como o 9-*cis* RA são produtos do metabolismo da vitamina A (retinol) que têm como precursores os carotenóides, sendo o mais importante deles o beta-caroteno (Marill *et al*, 2001) (Fig. 5).

Acredita-se que o RAR α possui importante papel no controle proliferativo dos promielócitos, assim como na diferenciação destas células em neutrófilos maduros. Evidências oriundas de diversos estudos e observações em linhagens celulares apontam que a via RA-RAR α representa importante função na maturação neutrofílica. Primeiro, tanto em camundongos como em humanos com deficiência de vitamina A é observada granulopoese imperfeita (Ghosh e Das, 1988). Segundo, os retinóides demonstram-se como inibidores proliferativos, assim como estimulam preferencialmente a granulopoese e não a diferenciação monocítica ou eritróide (Gratas *et al*, 1993; Tocci *et al*, 1996). Terceiro, o RAR α é expresso preferencialmente nas células da linhagem mielóide, distintamente dos outros membros da família RAR, o RAR β e o RAR γ (Labrecque *et al*, 1998; Zhu *et al*, 2001). Por fim, camundongos transgênicos carregando uma mutação no domínio LBD (*ligand binding domain*) do RAR α , a qual impossibilitava a ligação do ácido retinóico, demonstraram elevação da contagem dos neutrófilos imaturos (Kogan *et al*, 2000).

⁶ Sequências nucleotídicas de consenso curtas, geralmente no início da cadeia (upstream) a distâncias variáveis do gene a ser regulado, que são reconhecidas por fatores de transcrição reguladores específicos, e que promovem resposta gênica. (Hoffe, 2000).



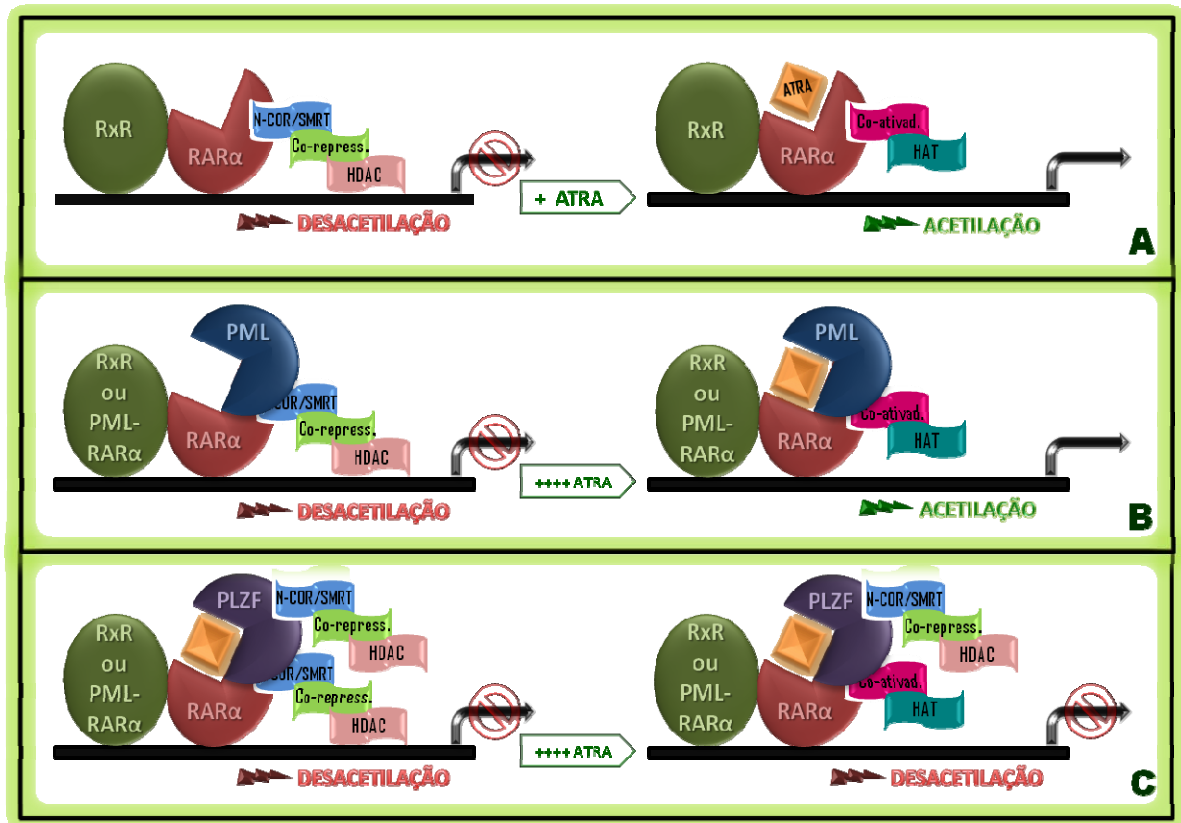
Fonte: Modificado de Wiegand e Chou, 1998.

Figura 5: Via metabólica do retinol.

Além de ser importante no processo da diferenciação granulocítica, a via RA-RAR α também tem um papel chave no direcionamento dos progenitores hematopoiéticos pluripotentes ao longo da linhagem granulocítica (Gratas *et al*, 1993; Labbaye *et al*, 1994). O trabalho de Tocci *et al* (1996) demonstrou que o ácido retinóico (RA) pode alterar o destino das células hematopoéticas progenitoras (HPCs – *haematopoietic progenitor cells*) fetais do fígado de tal maneira a causar um redirecionamento do programa de diferenciação celular. Desta forma estas células previamente comprometidas a um programa de diferenciação monocítica ou eritróide são conduzidas a via granulocítica devido à indução provocada pelo RA.

O modelo atualmente aceito para os mecanismos normais da função do RAR α , como um fator transcricional ligante-induzível, está baseado na capacidade do RAR α -desligado (desassociado do RA ou ligado a um antagonista) de ligar-se a elementos de resposta ao DNA com alta afinidade e poder inibir a diferenciação por associação a co-repressores, chamados SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormones*) e N-CoR (*nuclear receptor Co-repressor*). Por sua vez, estes co-repressores recrutam o

complexo de histonas desacetilases HDAC, induzindo a condensação da cromatina em consequência a desacetilação das histonas. A cromatina no estado condensado torna-se inacessível aos ativadores transcricionais, assim como à maquinaria de transcrição basal, por conseguinte, a transcrição é reprimida e os genes-alvo do RAR α são silenciados (Fig. 6A) (Chen e Evans, 1995; Mistry *et al*, 2003).



Fonte: O Autor.

Figura 6: Ativação transcricional modulada pela proteína RAR α selvagem e pelas proteínas quiméricas PML-RAR α e PLZF-RAR α . (A) o heterodímero RXR:RAR α (desligado) reprime a transcrição gênica através do recrutamento de um complexo repressor formado por N-CoR, SMRT, HDAC e outros co-repressores, desencadeando a desacetilação histônica. Ao ocorrer a ligação do ATRA, o heterodímero RXR:RAR α (ligado) libera o complexo repressor e liga-se a um complexo ativador com atividade de histona acetilase (HAT), resultando em ativação transcricional. (B) Semelhantemente aos receptores selvagens, a proteína quimérica PML-RAR α interage com o complexo repressor. No entanto, doses fisiológicas do ATRA não promovem o desligamento das proteínas repressoras. Apenas na presença de altas doses de ATRA os co-repressores são substituídos por co-ativadores que permitem a ativação da transcrição. (C) A proteína PLZF-RAR α , por sua vez, não responde às altas doses do ATRA devido à presença de um sítio de ligação aos co-repressores na porção da PLZF que permanece na proteína fusionada (Mistry *et al.*, 2003).

A união do ligante retinóide (RA) ao receptor (RAR α) induz uma mudança conformacional no domínio LBD (Fig. 4A) que permite que moléculas co-ativadoras se liguem a resíduos anteriormente inacessíveis, assim como a dissociação do complexo co-repressor. As várias moléculas co-ativadoras atuam conjuntamente para o início da transcrição de diversas formas incluindo a acetilação de histonas, através da atividade da histona acetilase (HAT), provocando o relaxamento do DNA através da ação da DNA helicase Trip1/sug1 e da interação com componentes da maquinaria de transcrição basal. O estado relaxado da cromatina permite o recrutamento dos fatores transcricionais basais para as regiões promotoras dos genes-alvo do RAR α , seguido pela iniciação da transcrição e promoção da granulopoese (Fig. 6A) (Glass e Rosenfeld, 2000). Desta forma, acredita-se que o RAR α possui uma função dual, onde o RAR α -desligado seria um regulador negativo da diferenciação granulocítica, enquanto o RAR α -ligado (associado ao RA) funcionaria como agonista estimulador da diferenciação (Kastner *et al*, 2001).

2.5.2 As Funções dos Parceiros do RAR α

São conhecidos atualmente cinco parceiros de fusão do RAR α na leucemia promielocítica (Tabela 3).

Dentre as proteínas de fusão parceiras do RAR α , a mais conhecida e estudada é a proteína PML. As funções fisiológicas precisas e atividades bioquímicas da PML ainda não são totalmente compreendidas. Não obstante, sabe-se que esta proteína está envolvida em diversos processos celulares, dentre eles: apoptose, senescência celular, regulação do crescimento celular, regulação transcricional, processamento do RNA, controle da estabilidade genômica, resposta à patógenos virais, apresentação antigênica e supressão tumoral (Borden, 2002).

Em células normais, a PML apresenta-se em discretas estruturas nucleares características denominadas corpúsculos nucleares (NBs - *nuclear bodies*) PML. Esta proteína sofre modificações pós-transcricionais, dentre as quais estão a fosforilação e a mudança por um pequeno modificador semelhante à ubiquitina (SUMO – *small ubiquitin-like modifier*), que afeta a localização celular final da PML. A forma não-modificada da PML é encontrada difusa no carioplasma, enquanto a PML modificada pela SUMO localiza-se nos NBs (Muller *et al*, 1998). Normalmente, as células possuem de 10 a 20 NBs por núcleo. Nestes corpúsculos nucleares foram identificadas mais de

30 proteínas com diversas funções celulares. Na presença da proteína quimérica PML-RAR α os NBs são rompidos e este fato é evidenciado pelo padrão de coloração microgranular do núcleo quando da utilização de anticorpos anti-PML. Estudos iniciais sugerem que a PML é essencial para manter a integridade funcional dos NBs (Zhong *et al*, 2000). Algumas proteínas também co-participantes da formação dos NBs, como o fator de iniciação da transcrição eucariótica 4E (eIF4E - eukaryotic translation initiation factor 4E) entre outras, são capazes de formar NBs na ausência da PML. No entanto, a presença da PML modificada pela SUMO nos NBs parece ser necessária ao recrutamento de outras proteínas, tais como a Daxx (*death-associated protein 6*) que funciona como um adaptador, trazendo outras proteínas componentes dos NBs que não estão diretamente ligados à PML. Isto implicaria na existência de uma hierarquia para a formação dos NBs, contudo o significado funcional desta evidência ainda não é clara (Borden, 2002).

A PML também está envolvida na regulação do crescimento celular e esta atividade é, ao menos em parte, dependente da integridade estrutural dos NBs. A superexpressão da PML provoca a parada do ciclo celular no estágio G1 e, em alguns casos, leva a apoptose (Melnick e Licht, 1999). O rompimento dos corpúsculos nucleares provocado por mutações no domínio RING (Fig. 4B) do gene *PML* está relacionado com a perda da sua atividade supressora do crescimento (Le *et al*, 1998), perda da atividade apoptótica e de regulação do transporte de determinados RNAs mensageiros (Lai e Borden, 2000; Cohen *et al*, 2001). No entanto, parece que o gene *PML* não é essencial à vida. Estudos em camundongos *PML*^{-/-} (knockout para o gene *PML*) mostraram que estes animais apresentam-se morfolologicamente normais e não possuem taxas de formação de cânceres espontâneos mais altas que os animais controles (Borden, 2002).

As funções dos parceiros menos frequentes do receptor RAR α estão descritas no Anexo 6.2.

Tabela 3: Comparação entre as proteínas de fusão parceiras do RAR α .

	<i>PML</i>	<i>PLZF</i>	<i>NPM</i>	<i>NuMA</i>	<i>STAT5b</i>
Isoformas	Cerca de 20 transcritos já foram identificados	Apenas uma iso-forma principal	Duas isoformas principais e uma terceira associada à matriz nuclear	Pelo menos três isoformas identificadas	Duas isoformas devido à clivagem proteolítica
Localização nuclear	Principalmente nos NBs, mas também encontrada no citosol e outras regiões nucleares	Em partículas nucleares parcialmente sobrepostas à PML	Principialmente nucleolar, mas também no nucléoplasma. Transporte para o citosol	Interfase: difusa e particulada (núcleo) Mitose: ligada aos pólos do fuso acromático	Inicialmento no citoplasma, após sofrer fosforilação vai para o núcleo
Padrão de expressão	Presente em células precursoras mielóides, tecidos inflmatórios	Progenitores de macrófagos CD34 ⁺ . Embrião de camundongos: SNC, fígado, coração, rim	Ubíqua	Ubíqua, exceto em algumas células em fase final de diferenciação	Extremamente expressa, peito, fígado, progênitores hematopoéticos, células T, células NK
Função	Envolvida na supressão do crescimento celular, diferenciação, resposta imune. Modulador transcricional	Supressor do crescimento celular, repressor transcricional, controle do desenvolvimento e diferenciação	Maturação de ribonucleoproteínas, transporte de proteínas citoplasmáticas para o núcleo. Modulador transcricional.	Papel estrutural na interfase e na mitose de células particulares. Principal alvo do programa apoptótico	Ativador transcricional envolvido no crescimento celular e funcionamento de células hematopoéticas e imunológicas
Hemodimerização	Através do domínio “coiled-coil”	Através do domínio BTB/POZ	Forma hexâmeros através de suas porções N- e C-terminais	Através do domínio C-terminal	Através do motivo “coiled-coil” N-terminal

Fonte: Modificado de Zelent, 2001.

2.6 A Importância do Diagnóstico Genético da Leucemia Promielocítica Aguda

Dentre as malignidades hematológicas, a LPA é uma das doenças melhor caracterizadas geneticamente e clinicamente. As lesões moleculares específicas desta entidade (rearranjos da região 17q21) distinguem um fenótipo único (leucemia mielóide aguda hiper ou microgranular – FAB-M3) sendo apenas esporadicamente reportadas fora desse subtipo (Mistry *et al.*, 2003).

Na LPA o diagnóstico morfológico, apesar de muito preditivo nos casos hipergranulares típicos, é considerado insuficiente. Isto por que pacientes com características morfológicas sugestivas de LPA sem rearranjos do receptor α do ácido retinóico, ou, contrariamente, pacientes cujos aspectos morfológicos não apontam para um diagnóstico de LPA, mas que possuem alguma das suas alterações genéticas específicas são frequentemente descritas na literatura (Lo Coco *et al.*, 1999). O rápido estabelecimento do diagnóstico de LPA é vital para manejo adequado do paciente. A isto está relacionado o risco significativo de morte por sangramento devido à diátese hemorrágica e o aumento do risco de recaída com baixa sobrevida se os pacientes com LPA responsiva à retinóide não forem tratados com o ATRA combinado à quimioterapia. De fato, o tratamento associado ao ATRA possui uma vantagem adicional, levando a uma rápida melhora do quadro da coagulopatia associada à doença. Além disso, a eficácia do tratamento indutor da diferenciação através dos retinóides é estritamente dependente da presença das fusões da região 17q21 que respondem a este tipo de tratamento. Sendo assim, a confirmação genética do diagnóstico é obrigatória (Burnett *et al.*, 1997; Mistry *et al.*, 2003). Portanto, todos os pacientes, incluindo aqueles com LPA hipergranular típica que iniciaram tratamento específico, devem ser estudados através de análises citogenética e moleculares para confirmação da fusão gênica específica e caracterização da sua isoforma para a monitorização molecular da doença residual mínima (DRM) (Grimwade e Lo Coco, 2002).

A identificação das alterações genéticas específicas da LPA em células leucêmicas pode ser realizada em nível de cromossomos, DNA, RNA e proteína com a utilização das técnicas de citogenética clássica (cariotipagem por bandeamento G), FISH, RT-PCR e anticorpo monoclonal anti-PML (PG-M3), respectivamente (Tabela 4) (Sanz *et al.*, 2005).

Tabela 4: Métodos para o diagnóstico genético da Leucemia Promielocítica Aguda.

<i>Nível Celular</i>	<i>Alvo(s)</i>	<i>Método(s)</i>	<i>Tempo gasto (h)</i>	<i>Vantagens principais</i>	<i>Principais inconvenientes</i>
Cromossomos	Rearranjos 17q21	Cariotipagem	16-48	Altamente específico	São necessárias culturas de 24-48h; rearranjos crípticos não são detectados (falso-negativos). Exige metáfases de boa qualidade
DNA	t(15;17) e/ou rearranjo 17q21	1.FISH 2.Southern blot	1. 6-24 2. 96-168	1. Especificidade e não precisa de células em divisão. 2. Altamente específico.	1. Alto custo e não identifica o tipo de fusão. 2. Laborioso e consome muito tempo.
RNA	Fusão <i>PML-RARα</i>	RT-PCR	4-6	Rápido, sensível; monitora a DRM.	Produção de RNA de baixa qualidade, contaminação e artefatos (falso-positivos).
Proteína (núcleo)	Distribuição microgranular da proteína nuclear PML.	Imunofluorescência ou imunohistoquímica.	2-3	Rápido, simples e de baixo custo	Artefatos devido à degradação celular. Não informa o tipo de fusão <i>PML-RARα</i> .

Fonte: Modificado de Sanz *et al.*, 2005.

As abordagens diagnósticas são focadas essencialmente na determinação da presença da fusão gênica oculta *PML-RARα*, que prevê uma resposta favorável a administração do ATRA e ATO, e na identificação dos casos com a fusão *PLZF-RARα*, que constituem quase 1% das LPA, e são refratários ao tratamento com estas drogas como únicos agentes terapêuticos (Sainty *et al*, 2000). Nas raras situações onde a LPA é confirmada morfológicamente, mas não é detectado o rearranjo *PML-RARα*, a análise citogenética pode revelar um rearranjo da região 17q12-21 indicando que o gene *RARα* está fusionado a outro parceiro de fusão alternativo desconhecido. Nestes casos, a identidade deste parceiro pode posteriormente ser confirmada por RT-PCR. Contudo, se a análise citogenética convencional não se mostra clara nos casos de LPA negativos para a fusão *PML-RARα*, a análise pela técnica de FISH ou Southern blotting utilizando sondas para o gene *RARα* pode confirmar se este está rearranjado e então a RT-PCR para análise da presença dos diversos genes alternativos parceiros do *RARα* pode ser realizada (Grimwade e Lo Coco, 2002).

2.6.1 Análise Citogenética

Atualmente a análise citogenética faz parte da rotina obrigatória de todos os pacientes recém-diagnosticados com qualquer subtipo de LMA. O cariótipo tem se

mostrado um fator prognóstico determinante nesta doença, prevendo a probabilidade de sucesso da indução a remissão, do risco de recaída e a sobrevida total. Além disto, o cariótipo está sendo usado na determinação da abordagem terapêutica em estudos clínicos de grande escala (Grimwade, 2001).

Na maioria dos pacientes com LPA confirmada morfológicamente, a presença do rearranjo *PML-RAR α* é confirmada pela presença da t(15;17) (Grimwade, 1999). No entanto, em estudos clínicos multicêntricos esta alteração não foi identificada pela citogenética clássica em cerca de 15% dos casos suspeitos de LPA, todavia na maioria destes foram posteriormente detectados rearranjos crípticos *PML-RAR α* (Burnett *et al*, 1999). Em alguns casos isto reflete uma limitação da cariotipagem; por exemplo, preparações cromossômicas diretas (culturas de 6-8h) podem levar a um cariótipo falso negativo, que seria apenas um reflexo das células medulares normais residuais, cujo crescimento foi relativamente favorável em relação aos blastos da LPA (Berger *et al*, 1981). Esta deficiência é geralmente superada através de culturas mais prolongadas (24-48h) das células leucêmicas antes da avaliação citogenética. Este procedimento vem sendo comumente adotado em casos com suspeita de LPA (Grimwade e Lo Coco, 2002). Contudo, apesar dessa medida, em alguns casos de LPA descritos como cariotipicamente normais, a técnica de nested RT-PCR detecta ambos os transcritos *PML-RAR α* e seu recíproco *RAR α -PML*, significando que a t(15;17) existia, porém não pôde ser detectada pela análise citogenética (Burnett *et al*, 1999). Adicionalmente, o rearranjo *PML-RAR α* pode também ser resultado de um evento de inserção, onde nestes casos os cromossomos 15 e 17 apresentam-se aparentemente normais, ou ainda resultado de outras alterações complexas envolvendo múltiplos cromossomos (Fig. 3) (Grimwade *et al.*, 2000).

A ocorrência de todos estes fatos sugere claramente que técnicas moleculares adicionais, tais como RT-PCR, FISH ou imunofluorescência anti-PML, são necessárias para complementar a citogenética clássica na confirmação de um diagnóstico de LPA. Entretanto, isto categoricamente não significa que a citogenética clássica deve ser abandonada ou substituída pelas técnicas moleculares, visto que ela é de fundamental importância na identificação de translocações alternativas e cuja caracterização fornece importantes informações acerca da patogênese da LPA como um todo. Além disso, a análise citogenética é extremamente valiosa na determinação de aberrações cromossômicas secundárias, as quais nos casos de LPA, ainda possuem importância biológica e clínica incerta (Grimwade e Lo Coco, 2002). A maior parte dos estudos

sugere que a presença de anormalidades citogenéticas adicionais não atribui efeitos deletérios aos resultados. De fato, evidências preliminares insinuam que resultados favoráveis também são observados em casos onde a t(15;17) convivem juntamente a marcadores citogenéticos, que em outros subtipos de LMA apontariam para um prognóstico desfavorável, tais como alterações na região 3q, -5/del(5q), -7 ou cariótipos complexos. No entanto, estas evidências precisam ser confirmadas em um maior número de pacientes (Grimwade, 2001).

Enquanto a cariotipagem de rotina assim como a FISH são altamente específicos para a confirmação do diagnóstico genético, a RT-PCR trás vantagens adicionais como as definições do ponto de quebra e da isoforma *PML-RAR α* , sendo esta última utilizada como um sensível marcador para a avaliação da resposta ao tratamento e monitorização da DRM (Sanz *et al.*, 2005).

2.6.2 FISH: Vantagens e Desvantagens

As análises por FISH podem fornecer uma valiosa abordagem na caracterização dos casos onde a citogenética convencional não revela a translocação clássica t(15;17). Uma importante vantagem da técnica de FISH é a possibilidade da mesma ser aplicada em diversos tipos de amostras (tecidos), isto inclui as células de cultura para a cariotipagem convencional, que permite a avaliação dos cromossomos (metáfase-FISH) e/ou núcleo (intérfase-FISH). Além disto, esfregaços de medula óssea e sangue periférico ou *citospins* podem ser utilizados para a realização de intérfase-FISH. Isto pode ser particularmente útil em situações em que a citogenética convencional e/ou a RT-PCR não puderam ser realizadas ou não deram resultados, principalmente quando as amostras são escassas em células (Grimwade e Lo Coco, 2002).

Embora as técnicas de pintura cromossômica sejam significativas para a caracterização de translocações complexas e variantes, elas não são adequadas para a investigação da maioria dos casos de LPA com o rearranjo *PML-RAR α* , devido à ocorrência de inserções, visto que as porções do material cromossômico rearranjado dos cromossomos der(15) ou der(17) são geralmente muito diminutas para serem detectadas. Portanto, na caracterização das fusões crípticas *PML-RAR α* são utilizadas sondas locus-específicas (LSI DNA Probe – *Locus Specific Identifier DNA Probe*) que flanqueiam ou abrangem todo o rearranjo cromossômico. No entanto, é de grande importância levar em conta o tamanho e a localização destas sondas, que podem ser adquiridas comercialmente, uma vez que estes parâmetros são necessários para a

avaliação dos resultados obtidos, principalmente em pacientes sem a fusão clássica t(15;17). O ideal é o uso de sondas cosmidiais⁷ específicas para a fusão *PML-RARα* relativamente pequenas, pois tal rearranjo pode não ser detectado se for oriundo de uma pequena inserção utilizando-se sondas muito extensas (Grimwade e Lo Coco, 2002).

Além disto, grupos de sondas projetadas para detecção da fusão gênica recíproca *RARα-PML* falharão na geração dos sinais de fusão nestes casos de inserção ou de simples translocações variantes, onde o produto recíproco não é formado (Grimwade *et al*, 2000). Outro contratempo diz respeito à interpretação do intérfase-FISH, uma vez que os cromossomos 15 e 17 normais podem estar muito próximos em alguns núcleos, e desse modo produzir sinais falso-positivos. Para contornar o problema é indispensável o estabelecimento de um limiar de positividade utilizando diversas amostras normais anteriormente conhecidas. Este limiar está em torno de 10% nos protocolos das sondas disponíveis atualmente (Grimwade e Lo Coco, 2002).

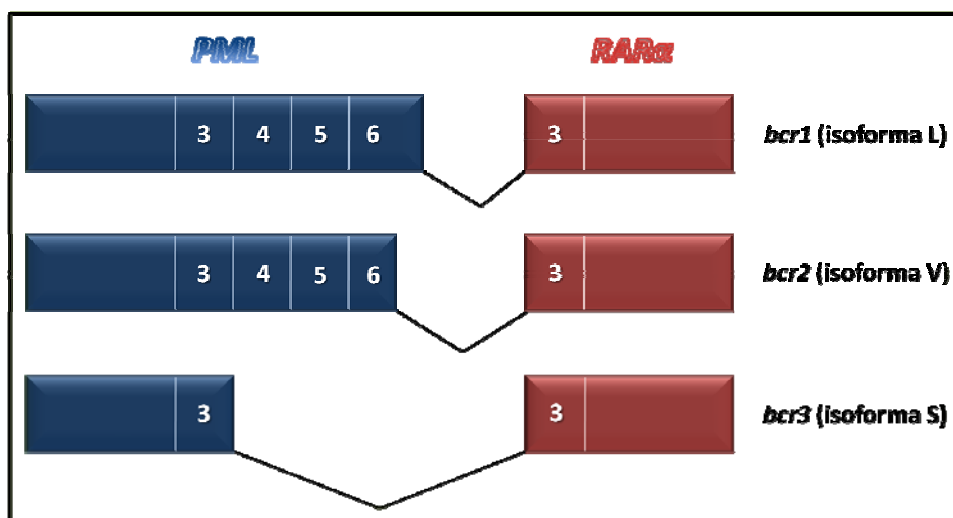
2.6.3 A RT-PCR no Diagnóstico Molecular da Leucemia Promielocítica Aguda

Dentre várias técnicas moleculares disponíveis, a RT-PCR (reverse transcriptase PCR) proporciona numerosas vantagens, contanto que precauções sejam tomadas para evitar os resultados falso-positivos devido à contaminação e falso-negativos pela utilização de RNA de baixa qualidade, falhas nas etapas de transcrição reversa ou na PCR, ou ainda pelo uso de primers inadequados devido à ocorrência de pontos de quebra pouco frequentes (Grimwade, 1999).

A RT-PCR pode fornecer rápida confirmação do diagnóstico clínico da LPA e neste contexto tanto amostras de sangue periférico como de medula óssea são adequadas para análise (Diverio *et al.*, 1996). Adicionalmente, ela possui a capacidade de detecção das diferentes regiões de quebra que resultam na formação heterogênea de transcritos *PML-RARα*, que em alguns estudos aparecem correlacionado a diversos caracteres da doença e possuem valor prognóstico (Gallagher *et al*, 1997; Burnett *et al*, 1999; Jurcic *et al.*, 2001). O mais freqüente ponto de quebra do gene *PML* ocorre no íntron 6, sendo o transcrito denominado *bcr1*, seguido da quebra no íntron 3 (*bcr3*) e com menor

⁷ Cosmídeo é um DNA de um vírus bacteriófago dentro do qual é inserido um fragmento de um genoma a ser amplificado e seqüenciado. Um cosmídeo é uma estrutura construída artificialmente que é utilizada para clonagem (cópia) de sequências de DNA. Tecnicamente, cosmídios são pequenos plasmídeos que possuem o sítio *cos* do fago lambda, necessário para o condensamento do DNA na cabeça fágica. O cosmídeo pode ser condensado no revestimento do vírus e transferido para a bactéria (*E. coli*) através de uma infecção viral. Como todos os genes virais, exceto o *cos*, estão ausentes, o cosmídeo pode conter aproximadamente o dobro de DNA exógeno (44kb) em relação a um vetor fágico (23kb) (Pierce, 2005).

freqüência no éxon 6 (*bcr2*). Os transcritos *bcr1*, *bcr2*, *bcr3* são denominados de longo (L), variante (V) e curto (S), respectivamente (Fig. 7) (Jurcic *et al.*, 2001).



Fonte: Modificado de (Lo Coco *et al.*, 1999).

Figura 7: Representação esquemática dos três principais transcritos quiméricos *PML-RARα*. O ponto de quebra do gene *RARα* ocorre sempre no íntron 2. Devido às diferentes quebras do gene *PML* (íntron 6, éxon 6 e íntron 3), diferentes segmentos deste gene se fusionam ao éxon 3 do *RARα*, produzindo os transcritos (isoformas) *bcr1* (L), *bcr2* (V) e *bcr3* (S), respectivamente. Os números representam os éxons dos genes *PML* e *RARα*.

Vários trabalhos têm sugerido que a presença do transcrito *bcr3* pode conferir um mau prognóstico, sendo identificados nestes pacientes tanto menor sobrevida livre de doença quanto menor sobrevida total (Vahdat *et al.*, 1994, Jurcic *et al.*, 2001). No entanto, este efeito foi mais evidenciado em estudos onde o ATRA foi administrado como único agente indutor durante a terapia e isto pode estar relacionado à diminuição da sensibilidade ao ATRA observada em estudos *in vitro* de casos com *bcr3* (Cassinat *et al.*, 2001). Em outros trabalhos, onde foram empregados simultaneamente o ATRA e quimioterapia como agentes indutores e antraciclínicos na fase de consolidação, nenhum efeito semelhante foi destacado para promover qualquer modificação na abordagem terapêutica (Burnett *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000).

A isoforma *bcr2* também tem sido associada a piores resultados. Entretanto, como estes transcritos estão presentes em apenas 5% dos pacientes e são heterogêneos molecularmente (variante), os casos estudados até hoje são insuficientes para excluir a possibilidade que algumas evidências estejam ocorrendo ao acaso e não sejam de fato efeitos biológicos genuínos (Reiter *et al.*, 2000; Mystry *et al.*, 2003). Dessa forma os

transcritos *bcr2* e *bcr3* são relacionados à piores prognósticos, sendo que o *bcr2* está mais associado a casos com baixa sensibilidade a terapia com o ATRA e o *bcr3* a altas contagens leucocitárias ao diagnóstico e a morfologia variante hipogranular, além de menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida total (Vahdat *et al.*, 1994; Gallagher *et al.*, 1997; Jurcic *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002; Mystry *et al.*, 2003).

A determinação do ponto de quebra do gene *PML* é também relevante para a escolha dos primers que serão usados posteriormente no acompanhamento da DRM, seja usando a RT-PCR convencional ou a técnica quantitativa ‘Real-Time’ RT-PCR (RQ-PCR) (Grimwade, 2002). O diagnóstico pela RT-PCR possui ainda outra vantagem que é a detecção dos transcritos recíprocos *RARα-PML*, os quais fornecem mais um alvo potencial para a monitorização da DRM e estão presentes em cerca de 75% dos pacientes (Burnett *et al.*, 1999).

A importância do diagnóstico molecular para o direcionamento terapêutico adequado dos pacientes com suspeita de LPA foi primeiramente sugerido por Miller *et al.* (1992) e foi posteriormente destacado em vários estudos incluindo o último estudo clínico MRC ATRA (*Medical Research Council*) (Grimwade *et al.*, 1999). Pacientes com apenas a evidência molecular da fusão *PML-RARα* possuem o mesmo prognóstico favorável que aqueles pacientes com a t(15;17) detectada, enquanto que os casos que não possuem comprovações molecular e citogenética para o rearranjo *PML-RARα* têm pior prognóstico (Burnett *et al.*, 1999).

2.6.4 O Papel da Imunofluorescência

Uma vez que a LPA é considerada uma emergência hematológica, um diagnóstico rápido é de suma importância. Enquanto a técnica RT-PCR convencional assim como as técnicas mais novas de RQ-PCR podem liberar um resultado dentro de um dia a técnica de imunofluorescência que utiliza anti-soro⁸ PML, policlonal ou monoclonal, pode ser realizada dentro de duas a quatro horas, através da qual um diagnóstico de uma LPA positiva para a fusão *PML-RARα* é confirmado pela detecção de um padrão microparticulado de coloração do núcleo (Dyck *et al.*, 1995; Grimwade *et al.*, 1996; Falini *et al.*, 1997).

⁸ Soro de origem humana ou animal, que é composto de anticorpos contra antígeno específico como os soros monovalentes ou para diversos antígenos, que são os soros polivalentes. Estes anticorpos são resultado de prévia imunização ou exposição ao agente da doença (Brunner e Suddarth, 2002).

A técnica de imunofluorescência é confiável nas seguintes condições: (1) a integridade das células seja preservada (este fato pode ser confirmado através da observação por contraste de fase ou pela utilização de um contra-corante nuclear); (2) os estirados de células sejam suficientemente delgados para prevenir a sobreposição dos blastos; (3) o material a ser analisado deve conter promieloblastos em quantidade razoável para a análise (i.e. se for utilizado sangue periférico para análise de pacientes com baixa contagem leucocitária, esta produzirá resultados falso-negativos caso blastos estejam ausentes neste tipo de amostra). Esta técnica é também adequada para análise de preparações não fixadas de medula óssea (sejam elas preparações frescas ou estocadas a -20°C), podendo ser realizada em amostras arquivadas (Hummel *et al.*, 1999; Grimwade *et al.*, 2000).

A proteína PML tipo selvagem está localizada no núcleo das células, formando corpos nucleares (2-20 por núcleo), enquanto a $\text{RAR}\alpha$ distribuí-se uniformemente no nucleoplasma. Por sua vez, a proteína quimérica PML- $\text{RAR}\alpha$ possui um padrão microgranular, com co-localização das proteínas PML e $\text{RAR}\alpha$ contrastando com o padrão normal de manchas da proteína PML do tipo selvagem (Villamor *et al.*, 2000; Gomis *et al.*, 2004).

O PG-M3 é um anticorpo monoclonal de camundongos (MoAb) direcionado contra a porção amino-terminal do produto gênico PML, o qual tem sido usado em ensaios imunohistoquímico ou imunofluorescente como uma ferramenta no diagnóstico genético da LPA (Falini *et al.*, 1997; Villamor *et al.*, 2000; Gomis *et al.*, 2004).

Estudos comprovaram que a detecção específica para o padrão de marcação nuclear microparticulada pela imunofluorescência anti-PML em blastos é exclusiva para os casos de leucemia mielóide aguda que expressam a proteína quimérica PML- $\text{RAR}\alpha$, por isso esta técnica identifica o grupo de pacientes apropriado para beneficiar-se dos tratamentos baseados no uso dos retinóides e trióxido de arsênico. Os casos onde o gene $\text{RAR}\alpha$ está fusionado a um gene parceiro alternativo (PLZF, NuMA, NPM ou STAT5b) ou em casos de LPA onde é identificada a ausência de rearranjos do $\text{RAR}\alpha$, o padrão selvagem macrogranular da distribuição nuclear da PML tem sido encontrado (Grimwade *et al.*, 1996; Wells *et al.*, 1997; Hummel *et al.*, 1999; Grimwade *et al.*, 2000).

A imunofluorescência anti-PML provou ser de grande valia no rápido estabelecimento do diagnóstico clínico da LPA, na condição de que nos casos prováveis

de possuírem rearranjos (15;17) crípticos, sejam realizados testes confirmatórios nos baseados em análises por FISH ou RT-PCR. Outro importante benefício da discriminação da LPA associada à fusão *PML-RARα* é a possibilidade de adequar regimes de quimioterapia menos intensivos para estes pacientes. Apesar desta técnica ser uma abordagem diagnóstica bastante útil, não deve ser considerada a substituição das técnicas moleculares, FISH e RT-PCR, por esta. Pois apenas a RT-PCR pode distinguir os diferentes transcritos do rearranjo *PML-RARα* e possui sensibilidade para detecção da DRM; e a FISH é a técnica ideal para a detecção das formas variantes dos rearranjos *RARα*, além de ser confirmatória nos casos onde a translocação clássica não é detectada pela citogenética convencional (Grimwade e Lo Coco, 2002).

Todas as técnicas descritas possuem suas limitações e a combinação de vários métodos é essencial para a avaliação completa do cariótipo. A combinação da citogenética clássica e molecular na leucemia aguda tem se destacado na determinação de alterações cromossômicas não aleatórias específicas de importância prognóstica. Além disso, estas técnicas podem detectar alterações cromossômicas complexas e proporcionar mais informações sobre as regiões envolvidas nessas trocas (Freitas *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).

2.7 Os Fatores Prognósticos na Leucemia Promielocítica Aguda

Diversos fatores determinados na fase anterior ao tratamento são preditivos sobre os resultados e evolução da doença em pacientes com LPA (Tabela 5).

Tabela 5: Fatores prognósticos na Leucemia Promielocítica Aguda.

<i>Fator Prognóstico</i>	<i>Observações</i>
Gene parceiro de fusão	Pior prognóstico nos casos de LPA com PLZF-RARα, devido à insensibilidade ao tratamento com ATRA e ATO
Nos casos com rearranjo PML-RARα	
1. <i>Contagem leucocitária/plaquetas</i>	1. Preditiva para taxa de RC e obtenção da TR
2. <i>Expressão de CD56</i>	2. Associado à maior TR
3. <i>Ponto de quebra PML</i>	3. Dados conflituosos; pior prognóstico para as isoformas <i>bcr2</i> e <i>bcr3</i> em alguns estudos
4. <i>M3 x M3v</i>	4. Piores resultados na morfologia M3v, associada à presença de alta WBC.
Idade	Taxas de óbito na fase de indução significativamente maiores em adultos mais velhos
DRM	Fator de risco independente para ocorrência de recaída

Legenda: RC, remissão completa; TR, taxa de recaída; M3, LPA hipergranular clássica; M3v, LPA microgranular variante; WBC, contagem leucocitária; DRM, doença residual mínima

Fonte: Modificado de Mistry *et al.*, 2003.

Elevadas taxas de óbitos durante a fase de indução e baixa sobrevida global são observadas em pacientes mais velhos e naqueles com altas contagens leucocitárias (Tallman *et al*, 2002). A expressão de CD56, detectado pelas provas imunofenotípicas, também é uma das variáveis preditivas de aumento do risco de recaída juntamente com a presença de elevadas contagens leucocitárias (Murray *et al*, 1999; Ferrara *et al*, 2000). Várias determinações de limite para estabelecer um pior prognóstico em relação a contagem leucocitária foram propostas, incluindo >2 , >5 e $>10 \times 10^9/L$ (Fenaux *et al*, 1999; Burnett *et al*, 1999). No entanto, atualmente a contagem leucocitária é considerada uma variável contínua⁹, portanto qualquer determinação de limite seria um tanto arbitrária. O grupo espanhol PETHEMA e o grupo italiano GIMEMA descobriram que a consideração da contagem plaquetária proporciona um fator prognóstico adicional, o qual é atualmente utilizado para estratificação de risco em seus protocolos, influenciando a intensidade de tratamento e a periodicidade da monitorização da DRM. Pacientes com contagem leucocitária $\leq 10 \times 10^9/L$ e plaquetas $> 40 \times 10^9/L$ possuem risco de recaída muito baixo, aqueles pacientes com contagem leucocitária $\leq 10 \times 10^9/L$ e plaquetas $\leq 40 \times 10^9/L$ têm prognóstico intermediário, enquanto que pacientes com WBC $> 10 \times 10^9/L$ possuem risco de recaída significativamente aumentado (Sanz *et al*, 2000).

⁹ Variáveis contínuas são variáveis numéricas que podem assumir, em princípio, qualquer valor em um determinado intervalo (Silva *et al*, 2003).

3. Referências Bibliográficas

- Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi P P, et al (1991). Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor α locus. *Proceedings National Academy Science USA* 88:1977-1981.
- Allford S, Grimwade D, Langabeer S, Duprez E, et al (1999). Identification of the t(15;17) in AML FAB types other than M3: evaluation of the role of molecular screening for the PML/RAR α rearrangement in newly diagnosed AML. The Medical Research Council (MRC) Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol* 105:198-207.
- Andrade CT, Oliveira CMF, Tabak D, Lucas EF, Coutinho FMB, Dias ML (2001). Dicionário de Polímeros. In: Editora Livraria Interciência, Rio de Janeiro, 1ª edição.
- Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Gr goire MJ, Berger R, Jonveaux P (1999). The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor α in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 8:1741-1749.
- Ball HJ, Melnick A, Shaknovich R, Kohanski RA, Licht JD (1999). The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic Acids Res* 27:4106-4113.
- Bardwell VJ and Treisman R (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* 8:1664-1677.
- Beckwith J. and Sihavy TJ (1992). The Power of Bacterial Genetics: A Literature-based Course. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1st edition.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1985a). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloide leukemia. A reporte of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103:620-625.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1985b). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloide leukemia. *Ann Intern Med* 103:626-629.
- Berger R and Coniat MB (2003). Double trisomy 8 and 21 in acute myelocytic leukemias, one with rearrangement of the RUNX1 gene. *Cancer Genet Cytogenet* 142(2):158-161.
- Berger R, Bernheim A, Daniel MT, Valensi F, Flandrin G (1981). Karyotype and cell phenotypes in primary acute leukemias. *Blood Cells* 7:287-292.
- Bernard J, Mathe G, Boulay J, Ceoard B, Chome J (1959). Acute promyelocytic leukemia: a study made on 20 cases. *Schweiz MedWochenschr* 89:604-608.
- Bernard J, Weil M, Boiron M (1973). Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. *Blood* 41:489-496.
- Borden KL (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 22:5259-5269.
- Borrow J, Goddard A D, Sheer D, Solomon E (1990). Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 249:1577-1580.
- Brendel C, Neubauer A (2000). Characteristics and analysis of normal and leukemic stem cells: current concepts and future directions. *Leukemia* 14:1711-1717.
- Brunner and Suddarth (2002). Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgico. In: Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9ª edição.

- Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Wheatley K, on behalf of the UK MRC Adult Leukemia Working Party (1997). All trans retinoic acid given concurrently with induction chemotherapy improves the outcome of APL: Results of the UK MRC ATRA trial. *Blood* 90:330a, (abstr, suppl 1).
- Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH (1999). Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the randomized MRC trial. *Blood* 93:4131-4143.
- Caligiuri MA and Bloomfield CD (2001). Molecular biology of leukemia. In: De Vita Vt Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 2389-404.
- Cassinat B, Chevret S, Zassadowski F, Balitrand N, Guillemot I, Menot M-L, Degos L, Fenaux P, Chomienne C (2001). In vitro all-trans retinoic acid sensitivity of acute promyelocytic leukemia blasts: a novel indicator of poor patient outcome. *Blood* 98:2862-2864.
- Chan PK and Chan FY (1995). Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 1262:37-42.
- Chan PK and Chan FY (1999). A study of correlation between NPM-translocation and apoptosis in cells induced by daunomycin. *Biochem Pharmacol* 57(11):1265-1273.
- Chan PK, Aldrich M, Cook RG, Busch H (1986a). Amino acid sequence of protein B23 phosphorylation site. *J Biol Chem* 261:1868-1872.
- Chan PK, Chan FY, Morris SW and Xie Z (1997). Isolation and characterization of the human nucleophosmin/B23 (NPM) gene: identification of the YY1 binding site at the 5' enhancer region. *Nucleic Acid Research* 25:1225-1232.
- Chan PK, Chan W, Yung B, Cook R, Aldrich M, Ku D, Goldknopf I, Busch H (1986b). *J Biol Chem* 261:14335-14341.
- Chan WY, Liu QR, Borjigin J, Busch H, Rennert OM, Tease LA, Chan PK (1989). Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 28:1033-1039.
- Chang CC, Ye BH, Chaganti RSK and Dalla-Favera R (1996). BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6947-6952.
- Cheadle C, Fan J, Cho-Chung YS, Werner T, Ray J, Do L, Gorospe M, Becker KG (2005). "Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics* 6(1):75.
- Chen JD, Evans RM (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457.
- Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A (1993). Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *Embo J* 12:1161-1167.
- Chen Z, Guidez F, Rousselot P, Agadir A, Chen SJ, Wang ZY, Degos L, Zelent A, Waxman S, Chomienne C (1994). PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1178-1182.
- Cheng S-Y (2005). Molecular Basis of Thyroid Cancer. In: *Book Serie Cancer Treatment and Research*, Springer US, 1st edition.

- Cigudosa JC, Calasanz MJ, Otero MD, Marin J, Bengoechea E, Gullon A (1995). A variant t(14;17) in acute promyelocytic leukemia. Positive response to retinoic acid treatment. *Cancer Genet Cytogenet* 80:160–161.
- Clarke CA and Glaser SL (2000). Acute myeloid leukaemia. *N Eng J Med* 342:358–61.
- Cohen N, Sharma M, Kentsis A, Perez JM, Strudwick S, Borden KLB (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* 20:4547–4559.
- Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4:529–533.
- Compton DA and Cleveland DW (1993). NuMA is required for the proper completion of mitosis. *J Cell Biol* 120:947–957.
- Compton DA, Szilak I, Cleveland DW (1992). Primary structure of NuMA, an intranuclear protein that defines a novel pathway for segregation of proteins at mitosis. *J Cell Biol* 116:1395–1408.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins (1996). *Patologia Estrutural e Funcional*. In: Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5ª edição.
- Cucuianu A (2005). Dominant and opportunistic leukemic clones: Proposal for a pathogenesis-oriented classification in acute myeloid leukemia. *Med Hypotheses* 65:107–113.
- Cunningham I, Gee TS, Reich LM, *et al* (1989). Acute promyelocytic leukemia: treatment results during a decade at Memorial Hospital. *Blood* 73:1116–1122.
- Darnell Jr. JE (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277:1630–1635.
- de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A (1990). The t(15; 17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347:558–561.
- de Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66:675–684.
- Dionne MA, Howard L, Compton DA (1999). NuMA is a component of an insoluble matrix at mitotic spindle poles. *Cell Motil Cytoskeleton* 42:189–203.
- Dong F, Liu X, de Koning JP, Touw IP, Henninghausen L, Larner A, Grimley PM (1998). Stimulation of Stat5 by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is modulated by two distinct cytoplasmic regions of the G-CSF receptor. *J Immunol* 161:6503–6509.
- Dong S and Tweardy DJ (2002). Interactions of STAT5b-RAR, a novel acute promyelocytic leukemia fusion protein, with retinoic acid receptor and STAT3 signaling pathways. *Blood* 99:2637–2646.
- Dong S, Zhu J, Reid A, Strutt P, Guidez F, Zhong H-J, Wang Z-Y, Licht J, Waxman S, Chomienne C, Zelent A, Chen S-J (1996). Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor-alpha fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3624–3629.
- Dumbar TS, Gentry GA and Olson MO (1989). Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* 28: 9495–9501.
- Dyck J, Warrell RP, Evans RM, Miller WH (1995). Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia by immunohistochemical localization of PML/RAR-A protein. *Blood* 86:862–867.
- Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Lo Coco F, Cordone I, Diverio D, Pasqualucci L, Biondi A, Riganelli D, Orleth A, Liso A, Martelli MF, Pelicci PG, Pileri S (1997).

- Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukemia (M3) with the monoclonal-antibody PGM3 (anti-PML). *Blood* 90:4046–4053.
- Fenaux P, Chastang C, Chevret S et al (1999). A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood* 94:1192–1200.
- Fenaux P, Wang ZZ, Degos L (2007). Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. *Curr Top Microbiol Immunol* 313:101-128.
- Ferrara F, Morabito F, Martino B et al (2000). CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *J Clin Oncol* 18:1295–1300.
- Freitas FA, Zambaldi LJG, Araújo M, Gatti E, Otubo R, Tsuchiya MR, Matsuda EI, Brandalise SR, Yunes JA (2004). A novel der(12)t(p15;q24.3) in a patient with childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 151:78-81.
- Gallagher RE, Willman CL, Slack JL et al (1997). Association of PML-RAR α fusion mRNA type with pretreatment hematologic characteristics but not treatment outcome in acute promyelocytic leukemia: an intergroup molecular study. *Blood* 90:1656–1663.
- Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA (2004). The molecular basis of leukemia. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program*. p. 80-97.
- Ghosh J and Das S (1988). A study on the effect of vitamin A deficiency and supplementation on tumorigenesis in mice. *Neoplasma* 35:41–49.
- Glass CK and Rosenfeld MG (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121–141.
- Gomis F, Sanz J, Sempere A, Plumé G, Senent ML, Pérez ML, Cervera J, Moscardó F, Bolufer P, Barragán E, Martín G, Sanz MA (2004). Immunofluorescent analysis with the anti-PML monoclonal antibody PG-M3 for rapid and accurate genetic diagnosis of acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol* 83(11):687-90.
- Gordon MB, Howard L, Compton DA (2001). Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J Cell Biol* 152:425-34.
- Gratas C, Menot ML, Dresch C, Chomienne C (1993). Retinoid acid supports granulocytic but not erythroid differentiation of myeloid progenitors in normal bone marrow cells. *Leukemia* 7:1156–1162.
- Grimwade D (1999). The pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. *Br J Haematol* 106:591–613.
- Grimwade D (2001). The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Baillière's Best Pract Res Clin Haematol* 14:497–529.
- Grimwade D (2002). The significance of minimal residual disease in patients with t(15;17). *Baillière's Best Pract Res Clin Haematol* 15:137–158.
- Grimwade D and Lo Coco F (2002). Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16:1959-1973.
- Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, Howe K, Dastugue N, Jansen J, Radford-Weiss I, Lo Coco F, Lessard M, Hernandez JM, Delabesse E, Head D, Liso V, Sainty D, Flandrin G, Solomon E, Birg F, Lafage-Pochitaloff M (2000). Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Français de Cytogénétique Hematologique, Groupe de Français d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted

- Action 'Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies'. *Blood* 96:1297–1308.
- Grimwade D, Diverio D, Harrison G, Wheatley K, Rogers J, Lo Coco F, Goldstone AH, Solomon E, Burnett AK (1999). Detection of minimal residual disease (MRD) in APL by 'real-time' RT-PCR: analysis of cases entered into the UK MRC ATRA trial. *Blood* 94 (Suppl. 1):625a(Abstr.).
- Grimwade D, Gorman P, Duprez E, Howe K, Langabeer S, Oliver F, Walker H, Culligan D, Waters J, Pomfret M, Goldstone A, Burnett A, Freemont P, Sheer D, Solomon E (1997). Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 90:4876–4885.
- Grimwade D, Howe K, Langabeer S, Davies L, Oliver F, Walker H, Swirsky D, Wheatley K, Goldstone A, Burnett A, Solomon E (1996). Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia (APL): cytogenetic, molecular and PML-immunofluorescence assessment of patients entered into the MRC ATRA trial. *Br J Haematol* 94:557–573.
- Gu BW, Xiong H, Zhou Y et al (2002). Variant-type PML-RAR (a) fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: use of a cryptic coding sequence from intron2 of the RAR (a) gene and identification of a new clinical subtype resistant to retinoic acid therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7640–7645.
- Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M (1997). Cleavage of the nuclear matrix protein NuMA during apoptosis. *Exp Cell Res* 233:21-24.
- Harborth J, Wang J, Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M (1999). Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *EMBO J* 18:1689-1700.
- Harborth J, Weber K, Osborn M (2000). GAS41, a highly conserved protein in eukaryotic nuclei, binds to NuMA. *J Biol Chem* 275(41):31979-85.
- He D, Zeng C, Brinkley BR (1995). Nuclear matrix proteins as structural and functional components of the mitotic apparatus. *Int Rev Cytol* 162B:1-74.
- Head DR (2004). Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology. Greer, J P; Foerster, J; Lukens, J N; Rodgers, G M; Paraskevas, F; Glader, B. 11th, Bippincott Williams & Wilkins, p. 2063-2076.
- Hillestad LK (1957). Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med Scand* 159:189-194.
- Hoffe PA (2000). Genética Médica Molecular. In: Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1ª edição.
- Hummel JL, Wells RA, Dube ID, Licht JD, Kamel-Reid S (1999). Deregulation of NPM and PLZF in a variant t(5;17) case of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 18:633–641.
- Jácomo RH, Figueiredo-Pontes LL, Rego EM (2008). Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. *Rev Assoc Med Bras* 54(1):82-9.
- Jácomo RH, Melo RAM, Souto FR, Mattos ER, Oliveira CO, Fagundes EF, et al (2007). Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. *Haematologica*, 92:1431-32.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (2001). Eds. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.
- Jansen JH, Lowenberg B (2001). Acute promyelocytic leukemia with a PLZF-RARalpha fusion protein. *Semin Hematol*. 38:37-41.
- Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, DeBlasio T, Warrell RP, Miller WH (2001). Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR

- isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 98:2651–2656.
- Kakizuka A, Miller WJ, Umesono K, Warrell RJ, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor PML. *Cell* 66:663-674.
- Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, Ghyselinck NB, Chambon P, Chan S (2001). Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARa. *Blood* 97:1314–1320.
- Kieslinger M, Woldman I, Moriggl R, Hofmann J, Marine JC, Ihle JN, Beug H, Decker T (2000). Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev.* 14:232-244.
- Kogan SC, Hong SH, Shultz DB, Privalsky ML, Bishop JM (2000). Leukemia initiated by PMLRARa: the PML domain plays a critical role while retinoic acid-mediated transactivation is dispensable. *Blood* 95:1541–1550.
- Koken MHM, Reid A, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Davies JM, Kabarowski JHS, Zhu J, Dong S, Chen S-J, Chen Z, Tan CC, Licht J, Waxman S, de The H, Zelent A (1997). Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10255-10260.
- Kondo T, Minamino N, Nagamura-Inoue T, Matsumoto M, Taniguchi T, Tanaka N (1997). Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* 15:1275-1281.
- Labbaye C, Valtieri M, Testa U et al (1994). Retinoic acid downmodulates erythroid differentiation and GATA1 expression in purified adult progenitor culture. *Blood* 83: 651–656.
- Labrecque J, Allan D, Chambon P, Iscove NN, Lohnes D, Hoang T (1998). Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors a1 and c. *Blood* 92:607–615.
- Lai HK, Borden KL (2000). The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* 19:1623-1634.
- Larson RA, Kondo K, Vardiman JW, Butler AE, Golomb HM, Rowley JD (1984). Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia. *Am J Med* 76: 827-841.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 11:1003-1013.
- Le XF, Vallian S, Mu ZM, Hung MC, Chang KS (1998). Recombinant PML adenovirus suppresses growth and tumorigenicity of human breast cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncogene* 16:1839-1849.
- Lee JH and Welch DR (1997). Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer* 71:1035-1044.
- Lee YD, Cho HI, Kang YH, Yun SS, Park SY, Lee YS, Kim Y, Lee DS (2004). The role of fluorescence in situ hybridization (FISH) for monitoring hematologic malignancies with BCR/ABL or ETO/AML1 rearrangement: a comparative study with FISH and G-banding on 919 consecutive specimens of hematologic malignancies. *Cancer Genet and Cytogenetics* 152:1-7.

- Leid M, Kastner P, Lyons R et al (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68:377-395.
- Levi M and Ten Cate H (1999). Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 341: 586-592.
- Li Y, Busch R, Valdez B, Busch H (1996). C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur J Biochem* 237:153-158.
- Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR, Michaux JL, Wu Y, Deblasio A, Miller WH Jr (1995). Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). *Blood* 85:1083-1094.
- Lichtman MA and Liesveld JL (2001). Acute Myelogenous Leukemia. In: Williams Hematology, Chap. 93, p.1047, 6th edition.
- Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG (1999). Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94:12-22.
- Longo L, Donti E, Mencarelli A, et al (1990a). Mapping of chromosome 17 breakpoints in acute myeloid leukemias. *Oncogene* 5:1557-1563.
- Longo L, Pandolfi P P, Biondi A, et al (1990b). Rearrangements and aberrant expression of the RAR α gene in acute promyelocytic leukemias. *J Exp Med* 172:1571-1575.
- Luderus ME, den Blaauwen JL, de Smit OJ, Compton DA, van Driel R (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14:6297-6305.
- Marill J, Capron C, Idres N, Chabot G (2001). Human cytochrome P450s involved in the metabolism of 9-cis- and 13-cis-retinoic acids. *Biochemical Pharmacology* 63:933-94.
- Matikainen S, Sareneva T, Ronni T, Lehtonen A, Koskinen PJ, Julkunen I (1999). Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2R α , c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood* 93:1980-1991.
- Mayani H (1996). Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 86:1041-1047.
- Mayer MP and Bukau B (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670-684.
- McLaughlin P, Estey E, Glassman A, Romaguera J, Samaniego F, Ayala A, Hayes K, Maddox AM, Preti HA, Hagemeister FB (2005). Myelodysplasia and acute myeloid leukemia following therapy for indolent lymphoma with fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone (FND) plus rituximab and interferon alpha. *Blood* 105:4573-4575.
- Melnick A, Licht JD (1999). Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93:3167-3215.
- Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D (2003). The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Reviews* 17:71-97.
- Miura I, Nishinari T, Hashimoto K, Nimura T, Miura S, Miura AB (1994). Translocation (8;17)(p21;q21), a possible variant of t(15;17), in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 72:75-77.

- Muller S, Matunis MJ, Dejean A (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17:61-70.
- Murray CK, Estey E, Paietta E et al (1999). CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: a possible indicator of poor treatment outcome. *J Clin Oncol* 17:293-297.
- Nakamaki T, Hino K, Yokoyama A, Hisatake J, Tomoyasu S, Honma Y, Hozumi M, Tsuruoka N (1994). Effect of cytokines on the proliferation and differentiation of acute promyelocytic leukemia cells: possible relationship to the development of "retinoic acid syndrome". *Anticancer Res.* 14:817-823.
- Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L (1999). The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93:1197-1207.
- Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann, IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103:127-140.
- Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC, Nigg EA (1990). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 60:791-801.
- Petrilli AS, Toledo SRC (2001). Aspectos Genéticos das Neoplasias Pediátricas. Cap. 35, p. 345-349, In: Doenças Genéticas em Pediatria.
- Pierce BA (2005). Genetica. In: Editore Zanichelli, Itália. 1ª ed. Pintão MCT e Franco RF (2001). Coagulação Intravascular Disseminada. *Medicina Ribeirão Preto* 34:282-291.
- Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM (2004). Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (1):118-45.
- Rapaport SI (1990). Hematologia Introdução. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 192-194.
- Redner RL (2002). Variations on a theme: the alternative translocations in APL. *Leukemia* 16:1927-1932.
- Redner RL, Corey SJ, Rush EA (1997). Differentiation of t(5;17) variant acute promyelocytic leukemic blasts by all-*trans* retinoic acid. *Leukemia* 11:1014-1016.
- Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ (1996). The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosminretinoic acid receptor fusion. *Blood* 87: 882-886.
- Rego EM, Falcão RP (2002). Leucemia Mielóide Aguda Diagnóstico: Morfologia, Imunofenótipo e Citogenética. Série Monografia Escola Brasileira de Hematologia 9:54-65.
- Reid A, Gould A, Brand N, Cook M, Strutt P, Li J, Licht J, Waxman S, Krumlauf R, Zelent A (1995). Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood*, 86:4544-4552.
- Ribeiro RC e Rego E (2006). Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. *Hematol (Am Soc Hematol Educ Program)*, p.162-168.
- Rolston R, Weck KE, Tersak JM, Sherer ME, Cumbie K, Shekhter-Levin S (2002). New cytogenetic variant, insertion (15;17)(q22;q12q21), in an adolescent with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 134(1):55-9.
- Rowley JD (1999). The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol* 36(suppl 7):59-72.
- Rund D, Ben-Yehuda D (2004). Therapy-related leukemia and myelodysplasia: evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Hematology* 9(3):179-87.

- Ruthardt M, Orleth A, Tomassoni L, Puccetti E, Riganelli D, Alcalay M, Mannucci R, Nicoletti I, Grignani F, Fagioli M, Pelicci PG (1998). The acute promyelocytic leukaemia specific PML and PLZF proteins localize to adjacent and functionally distinct nuclear bodies. *Oncogene* 16(15):1945-53.
- Ruthardt M, Testa U, Nervi C, Ferrucci PF, Grignani F, Puccetti E, Grignani F, Peschle C, Pelicci PG (1997). Opposite effects of the acute promyelocytic leukemia PML-retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and PLZF-RAR alpha fusion proteins on retinoic acid signalling. *Mol Cell Biol* 17:4859-4869.
- Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva LRJ, Graça CHN, Ferreira E, Hamerschlag N, Guerra JCC, Bacal NS, Andrade JAD, Borovik CL (2005). Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). *Rev Bras Hematol Hemoter* 27(2):94-101.
- Sainty D, Liso V, Cantú-Rajnoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Benattar L, Fenu S, Mancini M, Delabesse E, Duchayne E, Mahon F-X, Gutierrez N, Birg F, Biondi A, Grimwade D, Lafage-Pochitaloff M, Hagemeijer A, Flandrin G (2000). A new morphological classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying *PLZF-RARA* rearrangements. *Blood* 96:1287-1296.
- Santos SC, Lacronique V, Bouchaert I, Monni R, Bernard O, Gisselbrecht S, Gouilleux F (2001). Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene* 20(17):2080-90.
- Sanz MA, Jarque I, Martin G, et al (1988). Acute promyelocytic leukemia: therapy results and prognostic factors. *Cancer* 61:7-13.
- Sanz MA, Lo Coco F, Martin G et al (2000). Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 96:1247-1253.
- Sanz MA, Tallman MS, Lo Coco F (2005). Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 105:3019-3025.
- Saredi A, Howard L, Compton DA (1997). Phosphorylation regulates the assembly of NuMA in a mammalian mitotic extract. *J Cell Sci* 110:1287:1297.
- Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S, Melnick A, Lempert C, Waxman S, Zelent A, Licht JD (1998). The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol* 18:5533-5545.
- Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, et al (1995). Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein 80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood* 86:1954-1960.
- Silva EM, Silva EM, Silva SM (2003). Cálculo básico para cursos superiores. In: Editora Atlas, 1ª edição.
- Silva MLM, Land M, Heller A, Abdelhay E, Oliveira MSP, Ribeiro R, Lerner D, Liehr T (2005). New reagent t(3;17)(q26.3;q12) in an AML patient with poor outcome. *Oncology Reports* 3:663-666.
- Sirri V, Roussel P, Gendron MC, Hernandez-Verdun D (1997). Amount of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 28:147-156.
- Spiegelman BM, Heinrich R (2004). Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* 119 (2):157-67.

- Stunnenberg HG (1993). Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. *Bioessays* 15:309–315.
- Szebeni A, Mehrotra B, Baumann A, Adam SA, Wingfield PT, Olson MO (1997). Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry* 36:3941–3949.
- Tallman MS, Nabhan C, Feusner JH, Rowe JM (2002). Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood* 99:759–767.
- Tang TK, Tang CJ, Chao YJ, Wu CW (1994). Nuclear mitotic apparatus protein (NuMA): spindle association, nuclear targeting and differential subcellular localization of various NuMA isoforms. *J Cell Sci* 107:1389-1402.
- Tang TK, Tang CJ, Chen YL, Wu CW (1993). Nuclear proteins of the bovine esophageal epithelium. II. The NuMA gene gives rise to multiple mRNAs and gene products reactive with monoclonal antibody W1. *J Cell Sci* 104:249-260.
- Tawfic S, Olson M, Ahmed K (1995). Role of protein phosphorylation in post-translational regulation of protein B23 during programmed cell death in the prostate gland. *J Biol Chem* 270:21009-21015.
- Tocci A, Parolini I, Gabbianelli M et al (1996). Dual action of retinoic acid on human embryonic/fetal hematopoiesis: blockade of primitive progenitor proliferation and shift from multipotent/erythroid/monocytic to granulocytic differentiation program. *Blood* 88:2878–2888.
- Vahdat L, Maslak P, Miller WH Jr, Eardley A, Heller G, Scheinberg DA, Warrell RP Jr (1994). Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PMN/RAR-alpha isoform, and CD13 expression in patients treated with all-trans retinoic acid. *Blood* 84(11):3843-9.
- Villamor N, Costa D, Aymerich M, Esteve J, Carrió A, Rozman M, Aguilar JL, Falini B, Montserrat E, Campo E, Colomer D (2000). Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia by analyzing the immunocytochemical pattern of the PML protein with the monoclonal antibody PG-M3. *Am J Clin Pathol* 114(5):786-92.
- Wang Z-Y and Chen Z (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111:2505-2515.
- Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S (1997). Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet* 17:109-113.
- Wiegand U, Chou R (1998). Pharmacokinetics of oral isotretinoína. *J Amer Acad Dermatol* 39:S8-12.
- Witte T de, Oosterveld M, Span B, Muus P, Schattenberg A (2002). Stem cell Transplantation for leukemias following myelodysplastic syndromes or secondary to cytotoxic therapy. *Rev Clin Exp Hematol* 6:72-85.
- Wolkoff AG (2005). Dicionário Ilustrado de Termos Médicos e Saúde. In: Editora Rideel, 1ª edição.
- Yamada K, Sugimoto E, Amano M, Imamura Y, Kubota T, Matsumoto M (1983). Two cases of acute promyelocytic leukemia with variant translocations: the importance of chromosome No. 17 abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 9:93-99.
- Yang CH, Lambie EJ, Snyder M (1992). NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus. *J Cell Biol* 116:1303-1317.
- Yeyati PL, Shakhovich R, Boterashvili S, Li J, Ball HJ, Waxman S, Nason-Burchenal K, Dmitrovsky E, Zelent A, Licht JD (1999). Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* 18:925-934.

- Yoshida H, Naoe T, Fukutani H, Kiyoi H, Kubo K, Ohno R (1995). Analysis of the joining sequences of the t(15;17) translocation in human acute promyelocytic leukemia: sequence non-specific recombination between the PML and RARA genes within identical short stretches. *Genes Chrom Cancer* 12:37-44.
- Zatsepina OV, Rousselet A, Chan PK, Olson MO, Jordan EG, Bornens M (1999). The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J Cell Sci* 112:455-466.
- Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD (2001). Translocations of the RARa gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20:7186-7203.
- Zeng C, He D, Brinkley BR (1994). Localization of NuMA protein isoforms in the nuclear matrix of mammalian cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 29:167-176.
- Zhong S, Muller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95:2748-2752.
- Zhu J, Heyworth CM, Glasow A et al (2001). Lineage restriction of the RARa gene expression in myeloid differentiation. *Blood* 98:2563-2567.
- Zhu M, John S, Berg M, Leonard WJ (1999). Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. *Cell* 96:121-130.
- Zweyer M, Riederer BM, Ochs RL, Fackelmayer FO, Kohwi-Shigematsu T, Bareggi R, Narducci P, Martelli AM (1997). Association of nuclear matrix proteins with granular and threaded nuclear bodies in cell lines undergoing apoptosis. *Exp Cell Res* 230:325-336.

4. Manuscrito de Artigo Científico

Diagnóstico na leucemia promielocítica aguda da infância: citogenética clássica, FISH, RT-PCR e anticorpo monoclonal.

Bethânia de Araújo Silva Amaral^{1,2}, Terezinha de Jesus Marques-Salles^{1,2}, Eliane Maria Soares-Ventura², Ednalva Pereira Leite², Mariluze Oliveira Silva², Maria Tereza Cartaxo Muniz², Maíra de Freitas Mafra², Maria Teresa Marquin Cornélio Nogueira², Vera Lúcia Lins de Moraes², Maria Luiza Macedo Silva³, Neide Santos¹.

Manuscrito a ser enviado para *Cancer Genetics and Cytogenetics*

Diagnóstico na leucemia promielocítica aguda da infância: citogenética clássica, FISH, RT-PCR e anticorpo monoclonal.

Bethânia de Araújo Silva Amaral^{1,2}, Terezinha de Jesus Marques-Salles^{1,2}, Eliane Maria Soares-Ventura², Ednalva Pereira Leite², Mariluze Oliveira Silva², Maria Tereza Cartaxo Muniz², Maíra de Freitas Mafra², Maria Teresa Marquin Cornélio Nogueira², Vera Lúcia Lins de Moraes², Maria Luiza Macedo Silva³, Neide Santos¹.

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Genética, Recife, PE, Brasil.

²Centro de Oncohematologia Pediátrica (CEONHPE), Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brasil.

³Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Autor de correspondência:

Neide Santos

Departamento de Genética, CCB/UFPE,
Av. Prof Moares Rego, S/N, Cidade Universitária
50. 732-970 Recife, Pernambuco, Brasil.
Phone: (55081)2126-8520, Fax: (81)2126-8569
E-mail: santos_neide@yahoo.com.br

Resumo

Dentre as malignidades hematológicas, a leucemia promielocítica aguda (LPA) é uma das doenças melhor caracterizadas genética e clinicamente. Esta leucemia representa de 5% a 10% dos casos de LMA em populações de países desenvolvidos. No entanto, em países latino-americanos chega a cerca de 20% a 25%. A LPA é geneticamente caracterizada, invariavelmente, por rearranjos cromossômicos da região 17q21, os quais promovem a fusão do gene que codifica o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα*) com alguns genes “parceiros”. O mais freqüente destes genes é o gene da leucemia promielocítica (*PML*), o qual está associado com a t(15;17)(q22;q21) que leva a formação de dois genes de fusão, o *PML-RARα* e seu recíproco *RARα-PML*. A identificação das alterações genéticas específicas da LPA pode ser realizada em nível de cromossomos, DNA, RNA e proteína. Neste estudo foram analisados 15 pacientes com LPA através da citogenética clássica, FISH, RT-PCR e anticorpo monoclonal. A t(15;17) foi confirmada em sete pacientes pelo bandejamento G, o rearranjo *PML-RARα* foi confirmado pela FISH em 13 pacientes e a RT-PCR em quatro dos nove pacientes analisados. Nos cinco pacientes analisados com o anticorpo monoclonal PG-M3 todos apresentaram padrão microgranular de distribuição nuclear da proteína PML, confirmando o diagnóstico de LPA. Estes resultados ilustram a importância da análise combinada de diferentes métodos para a identificação da fusão do gene *PML-RARα* nos casos de LPA.

Palavras-chave: Leucemia promielocítica aguda (LPA), Diagnóstico genético, Bandejamento G, Anticorpo Anti-PML (PG-M3).

Introdução

A leucemia promielocítica aguda (LPA) se caracteriza por sua morfologia distinta, apresentando promielócitos anormais que possuem núcleo excêntrico e abundante granulações no citoplasma podendo conter vários bastonetes de Auer. A LPA é uma doença de extrema gravidade, pois sua apresentação clínica é caracterizada principalmente por distúrbios da coagulação manifestados por eventos de trombose que evoluem para quadros de francas hemorragias conhecida como coagulação intravascular disseminada (CID). Uma intervenção imediata com protocolos terapêuticos é essencial para interromper a morte do paciente [1,2]. A incidência da LPA em crianças com idade abaixo de 10 anos é baixa e aumenta progressivamente durante a adolescência, alcançando seu ápice no início da fase adulta. Esta leucemia representa de 5% a 10% dos casos de LMA, de acordo com estimativas de ocorrência em populações de países desenvolvidos. No entanto, em países latino-americanos essa incidência sobe para cerca de 20% a 25% [3]. Dados a respeito da epidemiologia da LPA no Brasil são escassos e baseiam-se, sobretudo, nos registros hospitalares. Recentemente um estudo realizado em 12 centros nacionais que tratam de neoplasias hematológicas apresentou um levantamento com 157 pacientes com LPA, os quais representaram 28% dos casos de LMA [4,5].

A LPA é geneticamente caracterizada pelo rearranjo do gene que codifica o receptor alfa do ácido retinóico (*RAR α* – *retinoic acid receptor alpha*) com o gene da leucemia promielocítica (*PML* – *promyelocytic leukemia gene*) resultante da translocação t(15;17)(q22;q21), a qual ocorre em mais de 95% dos casos [6-8]. No entanto, uma pequena parcela dos casos de LPA apresentam as translocações t(11;17)(q23;q21), t(11;17)(q13;q21), t(5;17)(q35;q21) ou a deleção intersticial no cromossomo 17 que são chamadas de translocações variantes da LPA e envolvem as fusões gênicas *PLZF-RAR α* , *NuMA-RAR α* , *NPM-RAR α* e *STAT5b-RAR α* , respectivamente [9-12].

A identificação das alterações genéticas específicas da LPA em células leucêmicas pode ser realizada em nível de cromossomos, DNA, RNA e proteína com a utilização das técnicas de citogenética clássica (análise citogenética por bandeamento G), FISH, RT-PCR e anticorpo monoclonal anti-PML (PG-M3), respectivamente [13]. As abordagens diagnósticas são focadas essencialmente na determinação da presença da fusão gênica oculta *PML-RAR α* , que prevê uma resposta favorável a administração do ATRA (ácido trans-retinóico) e ATO (trióxido de arsênico), e na identificação dos casos

com a fusão *PLZF-RARα*, que constituem quase 1% das LPA, e são refratários ao tratamento com estas drogas como únicos agentes terapêuticos [14].

Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil citogenético clássico/molecular e de biologia molecular, como também introduzir e estabelecer a detecção imunológica da proteína PML de forma a fornecer o diagnóstico e prognóstico acurados nos pacientes com LPA. Dessa forma, fornecendo subsídios para novas condutas terapêuticas e preventivas aos pacientes atendidos nas instituições que fizeram parte deste projeto, assim como contribuindo para a geração de conhecimento cromossômico/molecular das leucemias, uma vez que tais estudos são escassos no Brasil.

Estudos clínicos multicêntricos mostraram que a t(15;17) não foi identificada pela citogenética clássica em cerca de 15% dos casos suspeitos de LPA em exame morfológico. Todavia, na maioria destes casos foi posteriormente detectado rearranjos crípticos *PML-RARα* [15-17]. Isto mostra a importância de abordagens técnicas adicionais, tais como RT-PCR, FISH ou imunofluorescência anti-PML, para complementar a citogenética clássica na confirmação do diagnóstico de LPA.

Material e Métodos

Pacientes

Os pacientes deste trabalho fazem parte de um estudo multicêntrico consecutivo em leucemia mieloide aguda (LMA) que teve início em 2004, envolvendo o Instituto Nacional do Câncer (INCA/RJ) e o Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Oswaldo Cruz (CEONHPE/UPE). No período de 2004 a 2008 foram registrados 50 pacientes com LMA, destes 15 foram diagnosticados com LPA. O diagnóstico morfológico destes pacientes foi fornecido pelas instituições supracitadas.

Citogenética clássica e molecular

A cultura de medula óssea para obtenção de metáfases mitóticas seguiu os critérios de Silva *et al.* (2002) [18] e o bandeamento G para identificação individual dos cromossomos segundo Seabright, 1971 [19]. O perfil citogenético foi efetuado a partir da análise de 20 metáfases mitóticas, em média, e os critérios de identificação das alterações cromossômicas seguiu as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura Cromossômica (ISCN 2005) [20]. A técnica de FISH foi realizada de acordo com os protocolos dos fabricantes (Aquarius Probes e Vysis). As sondas utilizadas foram a *PML/RARα Translocation Probe Two Color Direct Labelled* (Aquarius Probes) para a

t(15;17) em todos os casos. Nos casos onde a FISH foi negativa para a t(15;17) a sonda LSI *RARA Dual Color Probe* (Vysis LSI DNA Probes) foi utilizada para a detecção de qualquer rearranjo envolvendo o gene *RARα*.

Imunofluorescência indireta com o anticorpo monoclonal PG-M3

A análise por imunofluorescência indireta foi realizada segundo Falini *et al.* [21] com modificações. O material utilizado nesta análise foi esfregaço de medula óssea a fresco ou células recuperadas de congelamento a -80°C em DMSO. Vale salientar que controles negativos de células congeladas a -80°C em DMSO e de medula óssea a fresco foram realizados para validação dos resultados. Em todos os casos foram preparadas lâminas contendo fina camada do material biológico a ser analisado, as quais foram inicialmente fixadas em metanol e seguiram o protocolo padrão, passando pelas etapas de fixação, incubação do anticorpo PG-M3 (Santa Cruz Biotechnology), incubação do anticorpo secundário conjugado a fluorocromo (FITC - Santa Cruz Biotechnology), lavagens e contra-coloração com DAPI que permitiu a contagem nuclear. O material foi analisado em microscópio de fluorescência para o estudo do padrão de distribuição da proteína PML. A proteína PML selvagem está localizada no núcleo das células e forma corpos nucleares (2-20 por núcleo), enquanto a *RARα* distribui-se uniformemente no nucleoplasma. Por sua vez, a proteína quimérica PML-*RARα* possui um padrão microgranular, com co-localização das proteínas PML e *RARα* contrastando com o padrão normal de manchas da proteína PML do tipo selvagem [22].

RT-PCR para fusão gênica *PML-RARα*

A separação de leucócitos do sangue total foi realizada utilizando-se Ficoll-Paque Plus® (Amersham Pharmacia Biotech). A extração do RNA foi realizada a partir das células armazenadas em Trizol® (Invitrogen) ou armazenadas em guanídio (extração por fenol-clorofórmio). A construção do cDNA foi realizada a partir de kits da ImProm-II™ *Reverse Transcription System*. Para avaliar a qualidade do cDNA foi utilizado um controle interno amplificado através de uma reação de PCR multiplex de acordo com o protocolo descrito por Lion e Kidd (1998) [23]. Os primers utilizados neste controle interno foram: PBGD, ABL, β 2MG e BCR. Os *primers* utilizados para a

detecção dos transcritos bcr 1/2 e bcr 3 foram baseados no protocolo descrito por van Dongen *et al.* (1999) [24] e estes foram:

	t(15;17) bcr 1/2	t(15;17) bcr 3
Oligo 5'	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA	CTGCTGGAGGCTGTGGAC
Oligo 3'	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA

Controles positivo e negativo foram utilizados para validar a reação e para identificar a ausência de produtos inespecíficos foi utilizado um branco sem adição de cDNA do paciente. As amostras foram submetidas a 35 ciclos de amplificação, em termociclador Eppendorf. O programa de amplificação consistiu em: desnaturação das amostras a 94°C, por 30 segundos, nos ciclos subsequentes; pareamento dos primers a 65°C, por 30 segundos; extensão da fita a 72°C, por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos. Foram retiradas alíquotas dos produtos de PCR para serem analisadas após migração em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio e marcador de peso molecular de 1kb *plus*.

Resultados

As informações clínicas como idade, sexo, *status* atual e diagnóstico, bem como os resultados da citogenética convencional (bandeamento G) e molecular (FISH com sonda para a fusão *PML-RAR α*), biologia molecular e imunofluorescência com o anticorpo monoclonal PG-M3 estão apresentados na Tabela 1.

A idade dos pacientes estudados variou de 3 a 17 anos, incluindo ambos os sexos, com média de 10,87 anos. Houve prevalência do sexo feminino na amostra (60%). A análise cariotípica com o bandeamento G revelou alterações cromossômicas em 11 pacientes e com em dois pacientes o cariótipo foi normal (Tabela 1).

A translocação t(15;17) (Fig. 1) foi detectada pela citogenética convencional em sete pacientes (46,7%) (casos 05, 08, 10-12, 14 e 15), dois apresentaram cariótipos normais (casos 01 e 02) e dois apresentaram alterações cromossômicas diferentes da t(15;17) (casos 03 e 04). A análise por FISH (Fig. 2) confirmou o rearranjo *PML-RAR α* em nove pacientes (casos 01, 02, 05, 08, 10-12, 14 e 15) e nas amostras que não apresentaram células em metáfases (casos 06, 07, 09 e 13). Nos casos 03 e 04 a FISH foi negativa para o rearranjo *PML-RAR α* , contudo, o caso 04 apresentou em 60% dos núcleos negativos um sinal extra para a região do gene *PML*.

A análise de RT-PCR para o rearranjo *PML-RAR α* foi realizada em nove pacientes (01 a 09), dos quais três apresentaram o transcrito *bcr 1* (casos 02, 08 e 09), o caso 01 apresentou o transcrito *bcr 3* e cinco casos foram negativos. Divergência entre as análises moleculares foram observadas em três pacientes (05 a 07), sendo positiva em todos estes casos a detecção da t(15;17) pela FISH e negativa pela RT-PCR.

A técnica de imunofluorescência indireta com o anticorpo monoclonal PG-M3 foi realizada em cinco pacientes (casos 05-09). Todos os casos apresentaram padrão microgranular de distribuição nuclear da proteína PML, confirmando o diagnóstico de LPA (Fig. 3). Todos estes casos apresentaram além da imunofluorescência positiva para a presença do rearranjo *PML-RAR α* , alguma das técnicas moleculares positivas para a presença da t(15;17), senão ambas.

Dos 15 pacientes aqui estudados, oito (53,33%) foram a óbito e sete encontram-se vivos, sendo que seis estão em remissão (40%) e apenas um em tratamento (6,67%).

Discussão

A leucemia é o tipo de neoplasia mais comum na criança, representando cerca de 30% de todas as doenças malignas em pacientes com idade inferior a 14 anos [25]. As LMAs correspondem a 20% das leucemias agudas em crianças, no entanto este grupo de doenças é muito pouco estudado, sendo este fato ainda mais evidente em nosso país. Os dados sobre esta patologia e sobrevida de crianças que sofrem com esta doença são insuficientes, visto que a grande maioria dos trabalhos publicados refere-se a estudos em adultos [26-32].

Dentre as malignidades hematológicas, a LPA é uma das doenças melhor caracterizadas genética e clinicamente. As lesões moleculares específicas desta entidade (rearranjos da região 17q21) assinalam um fenótipo único (leucemia mielóide aguda hiper ou microgranular – FAB-M3) sendo apenas esporadicamente reportadas fora desse subtipo [6].

Na LPA o diagnóstico morfológico, apesar de muito preditivo nos casos hipergranulares típicos, é considerado duvidoso. Isto por que os pacientes com características morfológicas sugestivas de LPA sem rearranjos do receptor do ácido retinóico α , ou, contrariamente, pacientes cujos aspectos morfológicos não apontam para um diagnóstico de LPA, mas que possuem alguma das suas alterações genéticas específicas são frequentemente descritas na literatura [33]. Estudos mostraram que aproximadamente 10% dos casos de LPA são erroneamente diagnosticados [19]. Isto porque as variantes morfológicas da LPA podem representar até 50% dos casos de LPA, juntamente com a semelhança da LPA a outros subtipos FAB de LMA [34]. Apesar de a LPA possuir subsídios clínicos e genéticos para um diagnóstico preciso, esta doença requer rapidez nos resultados de exames biológicos e clínicos para iniciar o tratamento, uma vez que a instalação da DIC, condição hematológica agressiva, evolui rapidamente para o óbito. Assim, o rápido estabelecimento de um diagnóstico de LPA é vital para manejo adequado do paciente estabelecendo a eficácia do tratamento indutor da diferenciação através dos retinóides estritamente dependente da presença das fusões da região 17q21 que respondem a este tipo de tratamento [6,35]. Sendo assim, todos os pacientes, incluindo aqueles com LPA hipergranular típica que iniciarem tratamento específico devem ser estudados através de análises cariotípica e molecular para confirmação da fusão gênica específica e caracterização da sua isoforma para a monitorização molecular da doença residual mínima (DRM) [15].

No presente estudo observou-se uma frequência de 46,67% da t(15;17), levando em consideração apenas a análise citogenética clássica. No entanto, quando aplicadas as técnicas moleculares, este percentual de detecção da t(15;17) subiu para 86,67%. Os cariótipos falsos negativos podem ser reflexo de problemas nas culturas de medula óssea para obtenção de preparações cromossômicas [36]. No entanto, neste trabalho foi tomada a precaução de efetuar culturas mais prolongadas (24-48h) das células leucêmicas antes da avaliação citogenética, procedimento este adotado em casos com suspeita de LPA e indicado pela literatura [15]. Além disto, diversos autores relatam que a morfologia dos cromossomos de pacientes com LPA é ruim, o que dificulta a visualização da alteração clássica [37-38]. Este resultado enfatiza que as técnicas moleculares adicionais, tais como RT-PCR e FISH são necessárias para complementar a citogenética clássica na confirmação de um diagnóstico de LPA. Entretanto, isto não significa que a citogenética clássica deve ser abandonada ou substituída pelas técnicas moleculares, visto que ela é de fundamental importância na identificação de translocações alternativas e cuja caracterização fornece importantes informações acerca da patogênese da LPA como um todo. Além disso, a análise citogenética é extremamente valiosa na determinação de aberrações cromossômicas secundárias, as quais nos casos de LPA, ainda possuem importância biológica e clínica pouco conhecidas [15]. Adicionalmente, a citogenética clássica é muito bem estabelecida, de baixo custo, fácil acesso e deve ser prioritária em centros com menos recursos ou sem a presença de laboratórios especializados.

Nos casos morfológicamente diagnosticados como LPA (casos 06, 07, 09 e 13, totalizando 26,67% da amostra) em que não foi possível obter células em metáfases, a aplicação da técnica de FISH confirmou a presença da t(15;17) nas amostras, mostrando assim a eficácia da FISH na detecção desse rearranjo em nossos pacientes, contribuindo para que a conduta terapêutica adequada fosse adotada nestes casos.

A análise da FISH mostrou dois casos com sinais extras para a região do gene *PML* (casos 04 e 06). O caso 04 apresentou dois cromossomos marcadores na análise por bandeamento G, mas na análise por FISH não foi possível determinar se o terceiro sinal correspondia a alguma parte dos marcadores devido à ausência de metáfases adequadas. O caso 06, por sua vez, foi um dos que não apresentaram metáfases mitóticas após a cultura e a origem do terceiro sinal também não foi identificada. De qualquer forma, o significado da presença de cópias extras do gene *PML* ainda não é conhecido, mas sabe-se que a proteína PML está envolvida em diversos processos

celulares, os quais incluem apoptose, senescência celular, regulação do crescimento e da transcrição, processamento do RNA, controle da estabilidade genômica, resposta a patógenos virais, apresentação de antígenos e supressão de tumores [6].

Neste estudo em dois casos (pacientes 03 e 04, totalizando 13,33% da amostra) não foi observada a presença da t(15;17) na citogenética clássica, e o rearranjo *PML-RAR α* não foi detectado nas técnicas moleculares. No primeiro momento, a presença de rearranjos alternativos do gene *RAR α* não pôde ser descartada na análise visto que os pacientes apresentaram cariótipos complexos (Tabela 1). Contudo, posteriormente foi realizada a FISH para a detecção da presença de rearranjos alternativos do gene *RAR α* nestes pacientes, sendo esta análise negativa em ambos os casos. É fato descrito na literatura a rara ausência de rearranjos *RAR α* em casos de LPA, no entanto não podem ser descartadas mutações do gene *RAR α* [7]. Além disto, a morfologia, imunofenotipagem e evolução clínica destes pacientes foram compatíveis com o diagnóstico de LPA.

Em nosso estudo dois casos (13,33%) apresentaram cariótipo normal. O achado de cariótipos normais na literatura tem sido explicado pela presença de rearranjos crípticos da fusão *PML-RAR α* , os quais são encontrados em cerca de 10% dos casos de LPA [39-40]. Quando realizadas as técnicas moleculares, FISH e RT-PCR, foi possível detectar a presença do rearranjo críptico da fusão *PML-RAR α* nos casos citados.

A técnica de imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal PG-M3 foi utilizada em cinco pacientes. Os cinco casos estudados pela técnica de imunofluorescência anti-PML apresentaram o padrão microparticulado, confirmando a presença da proteína quimérica *PML-RAR α* e todos foram confirmados pela FISH para o rearranjo *PML-RAR α* . É importante ressaltar que este trabalho está decorendo pela primeira vez no Brasil a introdução e caracterização do estudo monoclonal da LPA na infância, o qual poderá contribuir na taxa de cura das crianças brasileiras com esta doença. A detecção do padrão de marcação nuclear microparticulada pela imunofluorescência anti-PML em blastos é exclusiva para os casos LPA que expressam a proteína quimérica *PML-RAR α* , permitindo a identificação do grupo de pacientes apropriado para beneficiar-se dos tratamentos baseados no uso dos retinóides e trióxido de arsênio. Os casos onde o gene *RAR α* está fusionado a algum gene parceiro alternativo (PLZF, NuMA, NPM ou STAT5b) ou em casos de LPA que é relatada a ausência de rearranjos do *RAR α* , o padrão selvagem macrogranular da distribuição nuclear da PML tem sido encontrado [7].

Com relação ao emprego da RT-PCR em nosso estudo dentre os nove pacientes onde foi possível a aplicação da RT-PCR, em quatro (44,44%) foram detectados os produtos transcritos resultantes da fusão *PML-RAR α* , onde três apresentaram o transcrito longo (*bcr 1*) e um o transcrito curto (*bcr 3*). Em cinco pacientes a RT-PCR não detectou a presença dos transcritos, sendo que destes cinco, três apresentaram o rearranjo *PML-RAR α* na análise por FISH, além de padrão microgranular de distribuição nuclear da proteína PML na técnica de imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal PG-M3, confirmando a presença da t(15;17) clássica. Sabe-se que a RT-PCR é uma técnica muito sensível e de utilidade para o monitoramento da DRM durante o tratamento e revisões de acompanhamento do paciente. No entanto, esta técnica não está isenta de desvantagens e dificuldades técnicas, pois ela requer perícia habilidosa, assim como padronização inter-laboratorial apropriada para consecução de resultados e suas interpretações. Além disso, e a baixa qualidade do RNA extraído contribui significativamente para os achados falso negativos [23,33].

Atualmente os tipos de transcritos possuem valor prognóstico e estudos sugerem que a presença do transcrito *bcr3* pode conferir um mau prognóstico, sendo identificada nas células que expressam esta isoforma maior resistência à terapia de diferenciação com ácido retinóico, assim como à quimioterapia citotóxica ou ainda ao controle biológico/imunológico dos clones residuais do que células que expressam a isoforma longa (*bcr 1*) [41]. No entanto, este efeito foi mais evidenciado em estudos onde o ATRA foi administrado como único agente indutor durante a terapia, podendo estar relacionado à diminuição da sensibilidade ao ATRA observada em estudos *in vitro* de casos com *bcr3*. Nos trabalhos onde foram empregados simultaneamente o ATRA e quimioterapia como agentes indutores e antraciclínicos na fase de consolidação, nenhum efeito semelhante foi suficientemente destacado para promover qualquer modificação na abordagem terapêutica [42].

Devido às suas implicações prognósticas e terapêuticas é requerida uma atenção especial à LPA dentre as leucemias mielóides agudas. A literatura relata que taxa de sobrevida de no mínimo 5 anos chega a 80% dos pacientes com a terapia atual e a taxa de cura excede os 70% [2,3]. No entanto, a real situação dos resultados do tratamento da LPA em países em desenvolvimento, como o Brasil, é desconhecida [3]. Neste trabalho a taxa de mortalidade chegou a 53,33%, o que é um dado preocupante tratando-se de uma patologia considerada e tratada como uma doença que possui bom prognóstico. Além disto, deve-se levar em consideração o aumento incidência da LPA no Brasil

(>20% dos casos de LMA) [4], que segue a tendência dos países de origem latina. Esta tendência elevada levanta a hipótese de que a LPA possa estar relacionada à origem étnica e/ou à exposição a fatores ambientais distintos. Existe também a possibilidade da origem *in utero* da fusão *PML-RAR α* . Estudos revelaram que quando questionado o comportamento materno, a vida em cidades rurais e a exposição a produtos agrícolas, como pesticidas e/ou herbicidas, foram fatores comuns entre as mães de pacientes [43]. O trabalho de Jácomo *et al.* [4] observou uma alta taxa de mortalidade e levanta a hipótese de que o suporte deficiente durante a fase de indução, que é o período onde ocorre a maioria dos óbitos precoces, é o principal problema enfrentado pelos países em desenvolvimento. Além disso, neste mesmo trabalho os autores sugerem que o prognóstico da LPA não é favorável como é estabelecido.

Desta forma, o pronto diagnóstico e uma melhor atenção de suporte durante o tratamento, principalmente em suas fases iniciais se faz necessária ao trato desta malignidade, podendo-se constatar a vital importância da união de técnicas para a detecção, confirmação e monitoramento desta doença de evolução rápida e fatal. Adicionalmente enfatiza-se a importância da realização de estudos semelhantes em maiores e diferentes amostras no Brasil.

A estimativa para o biênio 2008/09 feita pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA/RJ/Brasil) informa que ocorrerão cerca de 9.890 novos casos de câncer por ano em crianças e adolescentes com até 18 anos de idade. O Brasil é um país de população jovem e a estimativa populacional para o ano de 2007 apontou que 38% da população brasileira encontrava-se na faixa abaixo dos 19 anos [32,44].

O câncer pediátrico é a segunda causa de óbito entre zero e 14 anos em países desenvolvidos, perdendo apenas para mortes por acidentes [45]. Em países em desenvolvimento o câncer pediátrico atualmente se destaca como principal causa de óbito. No Brasil, em 2005, a taxa de mortalidade por câncer em pacientes de 1 a 19 anos foi de 8% em relação a todos os óbitos, configurando a primeira causa de morte por doença nesta população em crianças e adolescentes. Este entendimento traz grandes e novos desafios à gerência das questões que cercam o trato oncológico, principalmente por parte do Sistema Único de Saúde (SUS) [44].

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos que colaboraram para a conclusão deste trabalho, aos pacientes e seus familiares que permitiram a realização deste estudo e ao Grupo de Apoio à Criança com Câncer (GAC) pelo incentivo a criação de projetos que visam à melhoria da vida dos pacientes com câncer. A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

Tabela 1: Resultados das análises por citogenética clássica e molecular (FISH), biologia molecular (RT-PCR), imunofluorescência (PG-M3).

Pacientes	Id/Sx	Citogenética	FISH sonda <i>PML-RARα</i>	FISH sonda <i>rearr. RARα</i>	RT-PCR	PG-M3	Status
01 [♦]	12a/F	46,XX[16]	P	-	<i>PML-RARα</i> [bcr 3]	-	VR
02 [♦]	15a/F	46,XX[18]	P	-	<i>PML-RARα</i> [bcr 1]	-	VR
03 [♦]	9a/F	47,XX,del(12p),add(14q),del(15q),i(19q),+mar[5]/ 46,XX,-9,del(12p),add(14q),del(15q),+mar[3]/ 46,XX, del(12p),add(14q),del(15q),i(19q)[6]/46,XX[4]	N	Negativo	Negativo	-	VR
04 [♦]	8a/F	48,XX,+2mar[4]/46,XX[18]	N (60% 3s. <i>PML</i>)	Negativo	Negativo	-	O
05 [♦]	4a/M	46,XY,t(15;17)[20]	P (80%)	-	Negativo	MiG. (MO)	O
06 [♦]	7a/F	Sem metáfase	P (3s. <i>PML</i>)	-	Negativo	MiG. (MO)	O
07 [♦]	17a/M	Sem metáfase	P	-	Negativo	MiG. (CC)	O
08 [♦]	16a/F	46,XX,t(15;17)[14]/46,XX[6]	P	-	<i>PML-RARα</i> [bcr 1]	MiG. (CC)	O
09 [♦]	15a/M	Sem metáfase	P	-	<i>PML-RARα</i> [bcr 1]	MiG. (CC)	VT
10 [*]	11a/F	46,XX,t(15;17)(q22;q12)[3]/46,XX[23]	P	-	-	-	VR
11 [*]	12a/M	46,XY,t(15;17)(q22;q12)[16]/46,XY[4]	P	-	-	-	O
12 [*]	3a/M	46,XY,t(15;17)(q22;q12)[18]/46,XY[5]	P	-	-	-	VR
13 [*]	12a/F	Sem metáfase	P	-	-	-	VR
14 [*]	9a/M	46,XY,t(15;17)(q22;q12)[8]/46,XY[14]	P	-	-	-	O
15 [*]	13a/F	46,XX,t(15;17)(q22;q12)[20]/46,XX[1]	P	-	-	-	O

Legenda: Id/Sx = idade/sexo; F = feminino; M = masculino; P = positivo; N = negativo; MiG. = microgranular; MO = medula óssea; CC = células congeladas; V = vivo em remissão; VT = vivo em tratamento; O = óbito; s. = sinais; [♦] = casos do HUOC/UPE; * = casos do INCA.

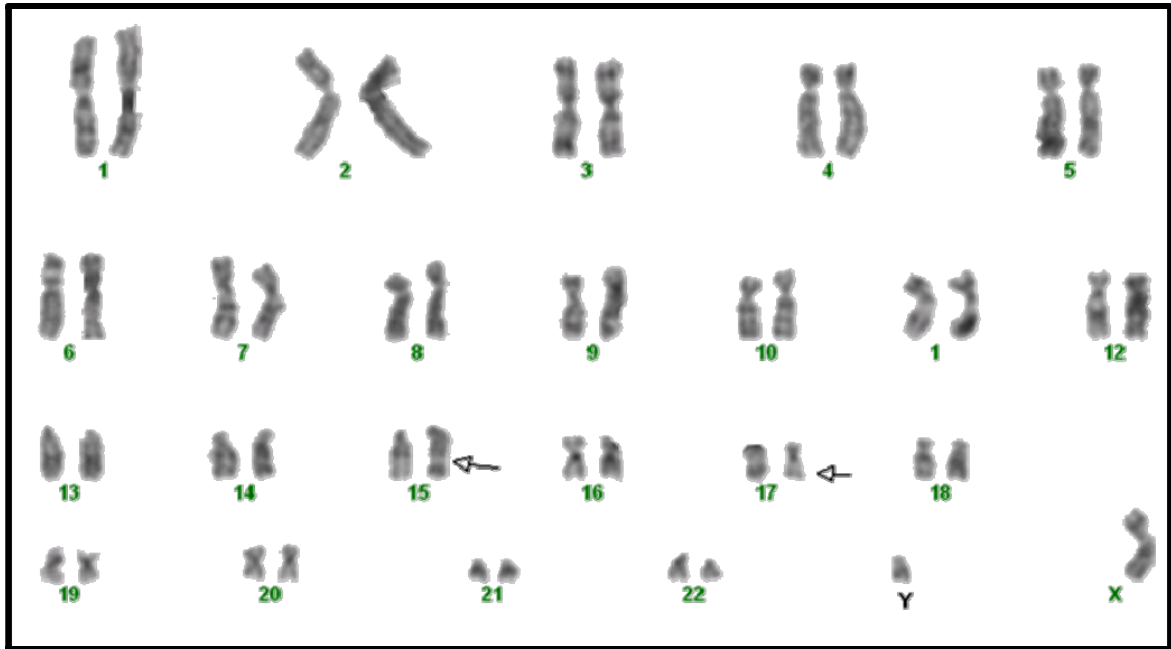


Figura 1: Cariótipo por bandeamento G (paciente 15) apresentando a $t(15;17)$.

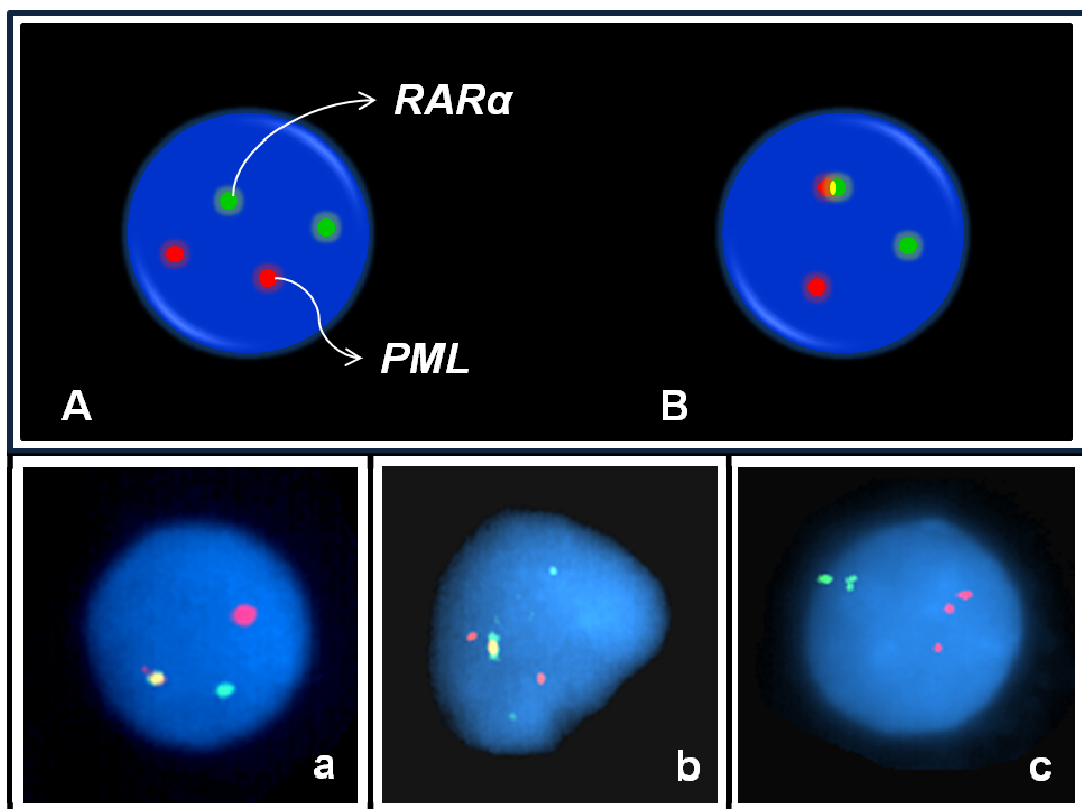


Figura 2: Análise pela FISH. *Esquema da visualização da técnica de FISH em núcleos interfásicos; (A) célula normal, (B) célula com o rearranjo PML/RARα. Análise dos pacientes; (a) núcleo positivo para fusão PML/RARα (paciente 02), (b) núcleo positivo para fusão PML/RARα com sinal extra para região do gene PML (paciente 06), (c) núcleo negativo para $t(15;17)$, porém com cópia extra da região do gene PML (paciente 04).*

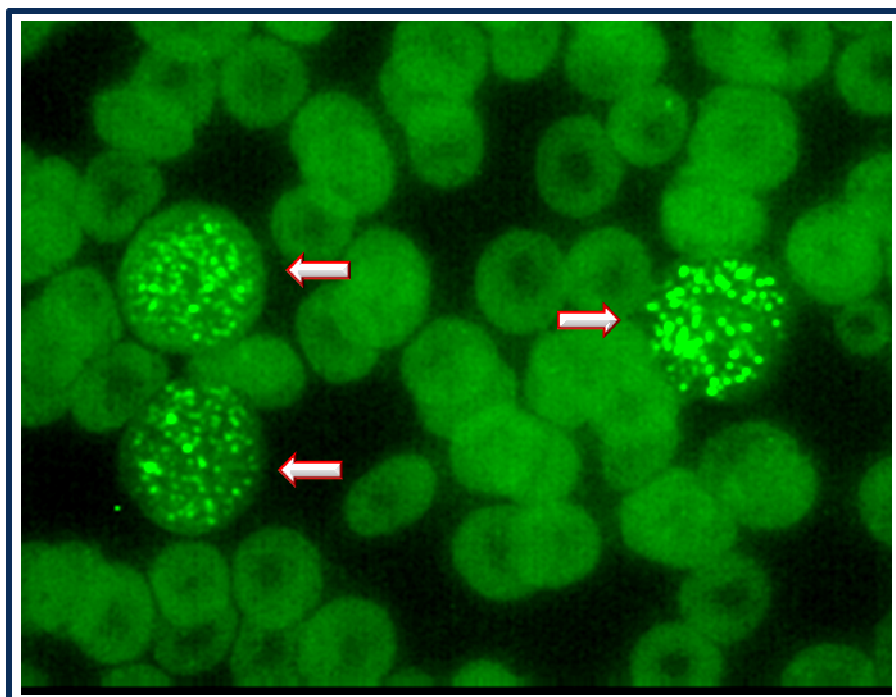


Figura 3: Imunofluorescência Indireta anti-PML (paciente 05) apresentando padrão microgranular determinando a presença da t(15;17). Setas apontam as células blásticas.

Referências

- [1] Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001.
- [2] Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva LRJ, Graça CHN, Ferreira E, Hamerschlag N, Guerra JCC, Bacal NS, Andrade JAD, Borovik CL. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). *Rev Bras Hematol Hemoter* 2005; 27(2):94-101.
- [3] Ribeiro RC e Rego E. Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. *Hematol (Am Soc Hematol Educ Program)* 2006; 162-168.
- [4] Jácomo RH, Melo RAM, Souto FR, Mattos ER, Oliveira CO, Fagundes EF, et al. Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. *Haematologica* 2007; 92:1431-32.
- [5] Jácomo RH, Figueiredo-Pontes LL, Rego EM. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. *Rev Assoc Med Bras* 2008; 54(1):82-9.
- [6] Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Reviews* 2003; 17:71-97.
- [7] Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, Howe K, Dastugue N, Jansen J, Radford-Weiss I, Lo Coco F, Lessard M, Hernandez JM, Delabesse E, Head D, Liso V, Sainty D, Flandrin G, Solomon E, Birg F, Lafage-Pochitaloff M. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogénétique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action 'Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies'. *Blood* 2000; 96:1297-1308.
- [8] Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C (1977). 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1(8010):549-50.
- [9] Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *Embo J* 1993; 12:1161-1167.
- [10] Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosminretinoic acid receptor fusion (1996). *Blood* 87: 882-886.
- [11] Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S. Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet* 1997; 17:109-113.
- [12] Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Gr goire MJ, Berger R, Jonveaux P. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor a in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1741-1749.
- [13] Sanz MA, Tallman MS, Lo Coco F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005; 105:3019-3025.
- [14] Sainty D, Liso V, Cantú-Rajnoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Benattar L, Fenu S, Mancini M, Delabesse E, Duchayne E, Mahon F-X, Gutierrez N, Birg F, Biondi A, Grimwade D, Lafage-Pochitaloff M, Hagemeijer A, Flandrin G. A new morphological classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying *PLZF-RARA* rearrangements. *Blood* 2000; 96:1287-1296.

- [15] Grimwade D and Lo Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16:1959-1973.
- [16] Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the randomized MRC trial (1999). *Blood* 93:4131-4143.
- [17] Grimwade D. The pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. *Br J Haematol* 1999; 106:591-613.
- [18] Silva MLM, Ornellas MHO, Ribeiro R, Land M, Azevedo A, Casconcellos F, Otero L, Vasconcelos ZFM, Bouzas LF, Abdelhay E. Cytogenetics analysis of 100 consecutive newly diagnosed cases of ALL in Rio de Janeiro Brazilian children. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 137:85-90.
- [19] Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 2:971-972.
- [20] ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer LG and Tommerup N, editors. S. Karger, publisher. Cytogenetic and Genome Research, 2005.
- [21] Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Lo Coco F, Cordone I, Diverio D, Pasqualucci L, Biondi A, Riganelli D, Orleth A, Liso A, Martelli MF, Pelicci PG, Pileri S. Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukemia (M3) with the monoclonal-antibody PGM3 (anti-PML). *Blood* 1997; 90:4046-4053.
- [22] Villamor N, Costa D, Aymerich M, Esteve J, Carrió A, Rozman M, Aguilar JL, Falini B, Montserrat E, Campo E, Colomer D. Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia by analyzing the immunocytochemical pattern of the PML protein with the monoclonal antibody PG-M3. *Am J Clin Pathol* 2000; 114(5):786-92.
- [23] Lion T and Kidd V. Appropriate controls for RT-PCR. *Leukemia* 1998; 12:1983-1993.
- [24] van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13:1901-1928.
- [25] Lopes LF. Leucemia na infância (1990). *Ver Paul Pediatr.* 8:79-81.
- [26] Silva DB, Povaluk P. Epidemiologia das leucemias em crianças de um centro de referência estadual (2000). *Arq Catar Med.* 29:3-9.
- [27] Fagundes EM, Rocha VG, Azevedo WM, Clementino NCD, Quintão JS, Ferraz MHC, et al. Leucemia mielóide aguda no adulto: análise retrospectiva de 99 casos (1995). *Bol Soc Hematol Hemoter.* 17:33-39.
- [28] Pulcheri W, Spector N, Nucci M, Morais JC, Pimenta G, Oliveira HP. The treatment of acute myeloid leukemia in Brazil: progress and obstacles (1995). *Haematologica* 80:130-135.
- [30] Chauffaille ML, Yamamoto M, Momcau JE, Braga GW, Souto EX, Kerbaux J. Cytogenetic abnormalities as prognostic factors in acute myeloid leukemia (1996). *Rev Ass Med Brasil* 42:200-204.
- [29] Martins SL, Falcão RP. Importance of immunophenotyping of leukemia myeloid acute (2000). *Rev Ass Med Brasil* 46:57-62.
- [31] Pagnano KB, Traina F, Takahashi T, Oliveira GB, Rossini MS, Lorand-Metze I, et al. Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience (2000). *São Paulo Med J.* 118:173-178.
- [32] INCA. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade (2008). Ministério da Saúde/INCA/SOBOPE. Rio de Janeiro.

- [33] Allford S, Grimwade D, Langabeer S, et al. Identification of the t(15;17) in AML FAB types other than M3: evaluation of the role of molecular screening for the PML/RAR- α rearrangement in newly diagnosed AML (1999). *Br J Haematol*. 105:198-207.
- [34] Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Wheatley K, on behalf of the UK MRC Adult Leukemia Working Party. All trans retinoic acid given concurrently with induction chemotherapy improves the outcome of APL: Results of the UK MRC ATRA trial. *Blood* 1997; 90:330a, (abstr, suppl 1).
- [35] Costa Neto JB, Faulhaber MW, Bacal NS et al. Diagnóstico de Leucemia Mielóide Aguda em adultos no período de jan/2001 a dez/2002 no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Israelita Albert Einstein/SP. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003;25(2 Supl):80.
- [36] Mancini M, Nanni M, Cedrone M, et al. Combined cytogenetic, FISH and molecular analysis in acute promyelocytic leukaemia at diagnosis and in complete remission. *Br J Haematol* 1995; 91:878-884.
- [37] Sucic M, Zadro R, Burazer B, et al. Acute promyelocytic leukemia M3: cytomorphic, immunophenotypic, cytogenetic and molecular variants. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2002;11:941-950.
- [38] Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, DeBlasio T, Warrell RP, Miller WH. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RARA isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2001; 98:2651-2656.
- [39] Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92:2.322-2.333.
- [40] Grimwade D, Gorman P, Duprez E, et al. Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1997; 90:4.876-4.885.
- [41] Cassinat B, Chevret S, Zassadowski F, Balitrand N, Guillemot I, Menot M-L, Degos L, Fenaux P, Chomienne C. In vitro all-trans retinoic acid sensitivity of acute promyelocytic leukemia blasts: a novel indicator of poor patient outcome. *Blood* 2001; 98:2862-2864.
- [42] Sanz MA, Lo Coco F, Martin G et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 2000; 96:1247-1253.
- [43] Mendes WL, Coser VM, Ramos G, Pereira W, Lopes LF, Pombo-Oliveira MS. The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil. *Haematologica* 2004; 89:(11)e135.
- [44] Little J. Introduction. In: Little J. *Epidemiology of childhood cancer*. Lyon; International Agency for Research on Cancer: World Health Organization (1999). IARC Scientific Publications, 149.
- [45] Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:12-22.

5. Conclusões

1. A cariotipagem através do bandeamento G além de eficiente na maioria dos casos estudados, permitiu a detecção de alterações cromossômicas outras que não envolvessem o rearranjo clássico t(15;17) presentes nos cariótipos dos pacientes com LPA.
2. Devido à alta eficiência da FISH na confirmação da fusão *PML-RAR α* , sempre que os pacientes apresentarem cariótipo normal ou na ausência de metáfases para a realização da cariotipagem, a FISH deverá ser usada em casos suspeitos de LPA.
3. A técnica de FISH mostrou-se mais eficiente na identificação do rearranjo molecular *PML-RAR α* do que a RT-PCR.
4. A imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal PG-M3 mostrou-se eficiente na confirmação do diagnóstico da LPA, tanto nas amostras frescas como em células congeladas.
5. A união das técnicas utilizadas no estudo foi essencial à conclusão final do diagnóstico de LPA.

6. Anexos

6.1 Guide for Authors – Cancer Genetics and Cytogenetics

Manuscripts should be submitted to Editor-in-Chief: Dr. Avery A. Sandberg, Cancer Genetics and Cytogenetics, Department of DNA Diagnostics, St. Joseph's Hospital and Medical Center, 350 West Thomas Road, Phoenix, AZ 85013, USA (Tel: 602-406-3588; Fax: 602-406-4118; E-mail: jvaugha@chw.edu). In addition to full-length research papers, Short Communications (no longer than 4 printed pages) and Letters-to-the-Editor (no longer than 2 printed pages) may be submitted. Review and Special articles will be published from time to time by invitation or arrangement with the Editor-in-Chief. Editorials may also be published from time to time. Book Reviews will be published as space permits. Manuscripts are submitted with the understanding that they are original unpublished work and are not being submitted elsewhere.

Manuscript. A computer disk must accompany the manuscript. Type double-spaced on 8½ x 11 in. bond paper. All materials are to be submitted in triplicate. On the title page, include full names of authors (no degrees), academic or professional affiliations, and complete address for the corresponding author. The phone and fax number and e-mail address (if available) of the corresponding author must be included. Except for Letters-to-the-Editor, all articles must include an abstract of up to 200 words. All tables, numbered with Arabic numerals, should have brief descriptive titles. Please use horizontal rules only. Authors not fluent in the English language should have their manuscripts edited by an expert in the language, prior to submission to the journal, thus avoiding delays in the review and publication of their papers. The journal will follow strictly the cytogenetic nomenclature and karyotype depictions given in ISCN 2005. Human gene names should be written in italicized capital letters and Arabic numbers. Any abbreviations should be defined when first used and be consistent throughout the text. Normal laboratory values should be provided in parentheses when first used. Authors seeking information about the status of their accepted papers can log-in at External link <http://authors.elsevier.com> (the reference number needed to track the paper will be sent by Elsevier as soon as the paper is received for publication).

Revised manuscript. Two copies of the revised text and pictorial materials with disk should be returned to the Editor-in-Chief, along with a detailed list of the revisions made. If changes suggested by the reviewers are not made by the authors, justification of this must also be submitted.

Computer disks. Please, observe the following: 1. Send a hard copy of your paper together with a disk (a disk should be included with the first submission and each subsequent revision). 2. Make sure that the disk and the hard copy match exactly. Please, note that failure to submit a computer disk will result in delays in publication. 3. Specify what software was used, including which release, e.g., Word 2000. 4. Specify what computer was used (IBM-compatible PC, Apple Macintosh, etc.). 5. The article file should include all textual material (text, references, tables, figure captions, etc.) and separate illustration files, if available. 6. The file should follow the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of this journal as given below. 7. The file should be single-spaced and should use the wrap-around end-of-line feature, i.e., returns at the end of the paragraphs only. Place two returns after every element such as title, headings, paragraphs, figure and table call-outs. 8. Keep a backup disk for reference.

Illustrations. At least 3 glossy or high-quality prints of karyotypes are to be submitted with the manuscript. If submitting electronic art, for karyotypes specifically, please provide the graphics as JPG, PDF, or TIFF files for the highest print production quality. Authors must label in black numbers the chromosomes accurately, both normal and abnormal, but refrain from including

annotations, which should appear in the legend. For line artwork, submit black-ink drawings of professional quality or glossies of originals. Duplicates may be photocopies. On the back of each illustration, give the first author's name, number of the figure, and indication of "top." The legends to figures must match the information in the illustrations, and must be typed on separate pages. For more information on submission guidelines for figures, visit External link <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Color art. Authors must enclose a letter agreeing to pay the color charge upon submission of their manuscript because such agreement must be received by the journal before the article can be published. Once a manuscript is accepted for publication, the exact charge will be determined by the publisher and a color agreement faxed or e-mailed to you in the form of a PDF. As a guideline, color artwork supplied with your article will appear in color on the web - at no charge. For reproduction of color illustrations in print, there is a \$650 charge for the first color picture and \$100 for every additional color picture in the article.

References. Authors must follow the instructions given. References are to be listed and numbered consecutively in the order in which they are cited in the text and not presented alphabetically. Include names of all authors for each reference. Authors are responsible for completeness and accuracy of all references. Citation in the text is by number in brackets, i.e. [1]. Periodical abbreviations should follow those given by Index Medicus. References must be styled as follows:

Journal. Maarek O, Salabelle A, Le Coniat MB, Daniel MT, Berger R. Chromosome 16 inversion-associated translocation: two new cases. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;114:126-9.

Book. Sandberg AA, Bridge JA. The cytogenetics of bone and soft tissue tumors. Austin: RG Landes Co., 1994.

Chapter. Sandberg AA, Chen Z. Cancer cytogenetics: nomenclature and clinical applications. In: Kurzrock R, Talpaz M, editors. *Molecular biology in cancer medicine*. London: Martin Dunitz Ltd, 1995; pp.54-84

Online publication. Health Care Financing Administration. 1996 statistics at a glance. Available at: External link <http://www.hcfa.gov/stats/stathili.htm> Accessed December 2, 1996.

Proofs and reprints. The corresponding author will receive proofs via e-mail in PDF format, which should be corrected and returned **within 48 hours of receipt**. Proofs must be carefully checked by the authors, as it is their responsibility to see that all errors are corrected and queries from editors answered. Any paid color art will be included in the PDF proof.

Copyright. Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. This transfer form is to be signed and returned to the publisher at the address shown on the form, which will ensure the widest possible dissemination of information under the U.S. Copyright Law.

Sponsored Articles:

Cancer Genetics and Cytogenetics offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please click [here](#).

AUTHOR ARTWORK INSTRUCTIONS

Help us reproduce your artwork to the highest possible standards - in both paper and digital formats

Submitting your illustrations, pictures, tables and other artwork (such as multimedia- and supplementary files) in an electronic format helps us produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail. These pages show how to prepare your artwork for electronic submission and include information on common problems, suggestions on how to ensure the best results, and image creation guides for popular applications. See the links under Application Guidelines for details about using specific artwork software for Windows and Macintosh platforms.

Checklist

Before you send us your artwork, make sure you can answer 'yes' to the following:

- My files are in the correct format - TIFF, EPS or PDF. MS Office files (Word, Powerpoint, Excel) are also accepted, provided they meet certain conditions. For more information, see [File Formats](#).
- My color images are provided in the RGB colorspace.
- The physical dimensions of the artwork match the dimensions of the journal to which I am submitting.
- The lettering used in the artwork does not vary too much in size. See [Sizing of Artwork](#).
- I have used the recommended naming conventions. See [File Naming](#).

If you are delivering your artwork on disk:

- All illustrations are provided as separate files and as hardcopy on separate sheets.
- All artwork is numbered according to its sequence in the text.
- Figures, schemes and plates have captions and these are provided on a separate sheet along with the manuscript, in addition all figures are referred to in the text.
- If required, I have specified the preferred magnification factor of my artwork on the sheet with filenames that accompany the disk.
- My artwork is on a 3.5" disk, CD-ROM, ZIP disk or JAZ disk. See [Acceptable Media](#).

FONT INFORMATION

To ensure that the final, published version (in print and online) matches your electronic file as closely as possible, make sure that you only use the following fonts in the creation of your artwork:

- Arial
- Courier
- Helvetica
- Symbol
- Times

When your artwork contains non-Elsevier standard fonts, Elsevier will substitute these fonts with an Elsevier standard font, which may lead to problems such as missing symbols or overlapping type.

6.2 As Funções dos Parceiros do RAR α (continuação)

A proteína PLZF é um fator de transcrição *zinc-finger* que possui 673 aminoácidos e pertence a uma família caracterizada por possuir o domínio BTB/POZ (*Broad complex, Tramtrack, Bric and brac/Pox virus and Zinc finger*), a qual é responsável pelos processos de homodimerização e heterodimerização, assim como pela repressão transcricional através da interação com o complexo HDAC e co-repressores (Fig. 4C) (Mistry *et al.*, 2003). O BTB/POZ pode atuar como um domínio de repressão transcricional e pode estar envolvido no processo de remodelação estrutural da cromatina (Bardwell e Treisman, 1994; Chang *et al.*, 1996).

A PLZF localiza-se no núcleo e sofre fosforilação em seus resíduos de serina e treonina. O exame por microscopia imunofluorescente revela a presença da PLZF num padrão de aproximadamente 50 pequenas partículas nucleares, sendo para isto necessária presença do domínio BTB/POZ (Reid *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1996; Ball *et al.*, 1999). O estudo de Koken *et al.* (1997) mostrou que as proteínas PML e PLZF compartilham parcialmente a localização nos NBs da PML, ao passo que o trabalho de Ruthardt *et al.* (1998) decreve a existência de estruturas nucleares particulares adjacentes para cada proteína. A quimera PLZF-RAR α não se localiza juntamente a PML, nem ao menos desloca a PML de suas estruturas nucleares de origem, indicando que desestruturação dos NBs da PML isoladamente não é essencial ao desenvolvimento da LPA. No entanto, na LPA com t(15;17) a PLZF aparece deslocada apresentando um padrão microparticular idêntico ao da PML-RAR α (Koken *et al.*, 1997; Grimwade *et al.*, 2000).

O mRNA da PLZF é expresso em células de linhagem mielóide indiferenciadas (Reid *et al.*, 1995). Chen *et al.* (1993) descreve que durante a diferenciação de linhagens celulares HL-60 e NB4 a expressão da PLZF sofre controle negativo¹⁰, sugerindo que a PLZF pode ser importante para a manutenção ou sobrevivência das células-tronco hematopoéticas. A PLZF regula genes envolvidos nos processos de diferenciação e proliferação celular, tais como os genes *ciclina A2*, *c-myc* e o complexo *hox*, além de ser um conhecido supressor de crescimento. Adicionalmente, é possível que a PLZF possua uma função supressora de tumor que é rompida no evento da t(11;17)(q23;q21) (Zelent *et al.*, 2001). A prole de camundongos nocauteados para o gene *PLZF* apresentam aumento da capacidade proliferativa e diminuição da apoptose, dados estes que corroboram com a função de supressão de crescimento da PLZF (Zelent *et al.*, 2001).

¹⁰ Controle negativo: processo no qual a célula diminui a quantidade de um componente celular (por exemplo, RNA ou proteína), pela diminuição da expressão gênica, em resposta a uma variável externa. Um exemplo para isto seria uma situação onde ocorre uma diminuição do número de receptores para uma determinada molécula (hormônio ou neurotransmissor, por exemplo) numa célula, que reduz a sensibilidade desta célula a esta molécula especificamente. Este fenômeno é um exemplo do mecanismo de feedback negativo atuando localmente (Cheadle *et al.*, 2005).

Semelhantemente à PML, a PLZF pode reprimir o crescimento de células em cultura. Células 32DCL3, que super-expressavam a proteína PLZF sofreram inibição acentuada de seu crescimento, acumulando-se na fase G1 e prolongando a fase S, além de apresentarem aumento da taxa de apoptose (Shaknovich *et al.*, 1998). O estudo de Yeyati *et al.* (1999) com células mielóides infectadas com um retrovirus contendo o gene *PLZF* sugere que a PLZF promove inibição do crescimento celular através da alteração da expressão de reguladores do ciclo celular, como a ciclina A. Seria possível que, uma vez ocorrido o evento da t(11;17)(q23;q21) na LPA, a função de supressor tumoral da PLZF seja corrompida. A proteína fusionada PLZF-RAR α pode agir como um inibidor dominante negativo da PLZF selvagem. De fato, a heterodimerização entre a PLZF-RAR α e a PLZF parece ser preferencial em relação à formação de complexos homoméricos¹¹ da PLZF (Dong *et al.*, 1996). Desta forma, níveis altos de expressão da proteína quimérica PLZF-RAR α em blastos com a t(11;17)(q23;q21) desviaria a PLZF selvagem de ligar-se aos seus genes-alvos naturais e/ou ligar-se a quantidades limitadas de co-fatores transcricionais da PLZF (Ruthardt *et al.*, 1997).

A Nucleofosmina (NPM) é uma fosfoproteína nucleolar expressada ubiquamente e acredita-se que ela tenha um importante papel no transporte de componentes ribossômicos e outras proteínas entre o citoplasma e o nucléolo, assim como teria participação nos processos de controle do crescimento celular (Szebeni *et al.*, 1997). O gene da nucleofosmina humana tem 25 kb e contém 12 éxons, sendo que o *splicing* alternativo de seus transcritos produzem duas isoformas principais, as quais diferem em suas regiões C-terminais (Chan *et al.*, 1997; 1989; Lee e Welch, 1997). Os caracteres estruturais da proteína incluem: dois domínios ácidos ricos em Asp/Glu, potenciais sítios ligantes para outras proteínas; um domínio biparticioinal de sinalização de localização nuclear (NLS - *nuclear localization signal*); um motivo de ligação à metais; um sítio de ligação ao ATP; sítios de fosforilação e um domínio de ligação à proteínas que posuam NLS (Chan *et al.*, 1986a,b; 1989; Li *et al.*, 1996). Ambas as isoformas formam hexâmeros através de seus domínios de oligomerização em suas porções N-terminais (Chan e Chan, 1995).

A NPM se localiza proeminentemente em regiões do nucléolo associadas ao processamento de ribonucleoproteínas (RNP) (Dumbar *et al.*, 1989). A (Fig. 4e) ilustra o domínio estrutural presente na NPM que permanece na proteína de fusão NPM-RAR α . O gene *NPM* é alvo de outros rearranjos presentes em distintas malignidades hematológicas, a saber, a

¹¹ Constituído por varios fragmentos idênticos (Wolkoff, 2005).

translocação t(3;5)(q25;q34-35) que causa a fusão *NPM-MLF1*, encontrada na síndrome mielodisplásica (SMD), e a t(2;5)(p23;q34-35) que gera o rearranjo *NPM-ALK*, observado no linfoma anaplásico de grandes células (Shiota *et al.*, 1995). O trabalho de Colombo *et al.* (2002) apresentou evidências de que a NPM pode ser um regulador crítico da p53. Este estudo mostrou que a NPM interage diretamente com a p53 e regula o aumento da estabilidade e ativação transcricional da p53 após diferentes tipos de estresse, assim como induz a senescência prematura na sua super-expressão em fibroblastos.

Os níveis de NPM são elevados em células em proliferação e em blastos leucêmicos. Isto ocorreria em consequência à demanda de precursores ribossomais (Kondo *et al.*, 1997). A expressão da NPM alcança seu ápice durante as fases S e G2 e está em níveis mínimos em G0 (Sirri *et al.*, 1997). Este dado pode ser relacionado ao fato que a NPM estimula especificamente a atividade da DNA polimerase α , ou pode simplesmente ser um reflexo da demanda metabólica da célula. Durante a fase G2 e a mitose, a proteína NPM é intensamente fosforilada pela cdc2. No transcorrer da progressão da mitose a NPM se associa às regiões pericromossômicas e aos NBs em formação, e dessa forma conectando funcionalmente os processos de desmontagem do núcleo e condensação cromossômica (Peter *et al.*, 1990). Uma fração das proteínas NPM pode se localizar nos pólos do fuso acromático juntamente com as proteínas NuMA durante a mitose (Zatsepina *et al.*, 1999). O trabalho de Okuda *et al.* (2000) mostrou que a NPM é o principal substrato do complexo ciclina E/cdk2 nos centrossomos. No entanto, a NPM associa-se apenas aos centrossomos não-duplicados e se desliga dos centrossomos duplicados após sofrerem fosforilação. A função da NPM nos centrossomos pode estar relacionada à sua atividade de chaperona, mantendo as proteínas em suas conformações apropriadas e possivelmente participando do processo de regulação da duplicação dos centrossomos.

A NPM é preferencialmente desfosforilada e degradada durante a apoptose ou dano celular (Tawfic *et al.*, 1995). A NPM se desloca reversivelmente do nucléolo para o nucleoplasma quando as células são expostas a condições de inibição da síntese de DNA/RNA ou da divisão celular (Chan e Chan, 1999). Desta maneira, semelhante a proteína PML, a NPM sofre mudanças em condições de estresse celular, indicando que ambas podem medir ou controlar os processos homeostáticos da célula (Zelent *et al.*, 2001).

A proteína NuMA, que até o momento foi envolvida em apenas um caso de LPA com t(11;17)(q13;q21), tem papel ativo na divisão mitótica. Ela é uma proteína abundante, conservada e ubiquamente expressa que está envolvida na finalização da mitose e na reconstrução do núcleo nas células-filhas pós-mitóticas (Compton *et al.*, 1992; He *et al.*, 1995).

O gene *NuMA* codifica uma proteína de 2115 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 230 kDa. O *splicing* alternativo dos seus transcritos também podem produzir proteínas com 1776 e 1763 aminoácidos (Tang *et al.*, 1993, 1994). A proteína NuMA é dividida em dois domínios globulares, um em cada porção final da proteína, com uma região central *coiled-coil* de 1485 aminoácidos (Compton *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1992). Os motivos *coiled-coil* provavelmente são responsáveis pelos processos de homodimerização e heterodimerização (Yang *et al.*, 1992). A região C-terminal contém o domínio para fosforilação agenciada pela cdc2 e outras quinases, além de sequências que promovem a sinalização de localização nuclear (NLS) e no fuso mitótico da proteína (Compton e Cleveland, 1993) (Fig. 4D). A NuMA pode protagonizar uma função estrutural no ancoramento dos pólos do fuso acromático da célula (Dionne *et al.*, 1999).

A NuMA é regulada através do ciclo celular por modificações pós-transcricionais. Por exemplo, a proteína NuMA é fosforilada pelo complexo cdc2/ciclina B no início da divisão mitótica e se associa aos microtúbulos do fuso mitótico (Saredi *et al.*, 1997). Esta proteína pode ser requisitada para a formação dos pólos e astes do fuso acromático, assim como para a reorganização dos núcleos das células-filhas para a finalização da divisão celular (Gordon *et al.*, 2001). Ao final da mitose, a NuMA sofre clivagem proteolítica e desfosforilação. Quando as células progridem para fase G1, a NuMA remanescente é revertida a sua forma insolúvel, a qual irá formar uma cadeia fibrosa que pode ter uma função estrutural na formação do arcabouço nuclear (Harborth *et al.*, 1999). Nas células em intérfase esta proteína encontra-se difusa no núcleo, seguindo um padrão particulado, assim como as outras proteínas parceiras da RAR α na LPA associadas à matriz nuclear (Zeng *et al.*, 1994). No entanto, a proteína NuMA anexa-se às regiões de associação à matriz nuclear (MAR - *matrix attachment regions*), que são importantes para o processo de compactação da cromatina dentre outros (Luderus *et al.*, 1994). O trabalho de Harborth *et al.* (2000) encontrou um provável regulador transcricional ao qual a NuMA se liga, implicando numa possível participação na regulação da transcrição por parte da NuMA.

A proteína NuMA é um alvo precoce da proteólise pelas caspase-3 e caspase-6, que produz um produto proteolítico que pode atuar como um fator dominante negativo, corrompendo a estrutura nuclear normal. Desta forma, a liberação da NuMA das MARs facilitaria a fragmentação do DNA característico no processo apoptótico (Zweyer *et al.*, 1997). Em resumo, a proteína NuMA é um componente celular que responde prontamente aos sinais do ciclo celular e não um fator de controle da proliferação celular. Isto significa que é pouco provável que a

inibição da função desta proteína possa contribuir ao processo oncogênico (Gueth-Hallonet *et al.*, 1997).

Finalmente, a proteína STAT5b também se funde a RAR α através de uma deleção intersticial de 3Mb no braço longo de cromossomo 17 (Arnold *et al.*, 1999). Existem sete membros na família das proteínas STAT, os quais são fatores de transcrição que residem no citoplasma até terem seus resíduos específicos de tirosina fosforilados depois da ativação de vários receptores de citocinas. A ligação de uma determinada citocina a um receptor específico induz a dimerização destas proteínas e a ativação da tirosina quinase. A STAT5b, assim como as outras proteínas STAT, se ligam a quinase JAK através do domínio SH2 e depois é autofosforilada em seu resíduo C-terminal (Fig. 4F). Assim a STAT5b pode então se homodimerizar, através do seu domínio *coiled-coil*, e migrar para o núcleo para ligar-se a um elemento GAS (*Gamma interferon activation site*) (Darnell, 1997). A ativação anormal das proteínas da família STAT está envolvida no processo de transformação celular em diversos tipos de câncer, incluindo leucemias e linfomas (Mistry *et al.*, 2003). A proteína STAT5b é amplamente expressa em vários tecidos, incluindo os progenitores hematopoéticos e pode ser ativada por diversas citocinas, dentre elas a prolactina, GM-CFC, EPO e IL-3 (Dong *et al.*, 1998). Dentre os genes alvejados pela STAT5b encontram-se genes relevantes a hematopoese, incluindo o *c-myc* e o gene do receptor da IL-2 (Matikainen *et al.*, 1999; Gesbert e Griffin, 2000). Camundongos com deficiência de STAT5b apresentam aumento da apoptose em resposta a indução da diferenciação pelo fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Kieslinger *et al.*, 2000). Adicionalmente, esta proteína pode induzir a expressão do gene anti-apoptótico *Bcl-x* e, portanto, deve ter um papel na prevenção da apoptose durante a fase final da diferenciação mielóide (Santos *et al.*, 2001).

A quimera STAT5b-RAR α contém a maioria dos domínios da proteína STAT5b. Sua região N-terminal possui um domínio *coiled-coil* responsável pela dimerização e pela interação com uma proteína chamada Nmi1 (*N-Myc interactor*), a qual potencializa a ligação das proteínas STAT aos co-ativadores transcripcionais de acetilação p300/CBP (*E1A binding protein p300/CREB binding protein*), que juntos aumentam a transcrição de IL-2 e INF- γ (Zhu *et al.*, 1999; Spiegelman e Heinrich, 2004). Este domínio deve permitir que a STAT5b-RAR α sequestre os co-ativadores dos receptores normais remanescentes na célula. O domínio de ligação ao DNA localiza-se no centro da proteína, sendo seguido pelo domínio SH3 e pelo domínio SH2 truncado. Um estudo preliminar indica que a fusão STAT5b-RAR α pode formar hemodímeros, assim como heterodímeros com os receptores RXR nos elementos de resposta ao

ácido retinóico (RAREs) (Dong e Tweardy, 2000). Igualmente às outras formas homodiméricas da RAR α na LPA, a proteína de fusão STAT5b-RAR α possui alta afinidade com os co-repressores SMRT, ocorrendo o desligamento apenas quando a concentração de ATRA chega a 10^{-6} M (Zelent *et al.*, 2001). Como um heterodímero, a proteína quimérica possui alta capacidade para sequestrar os RXRs. Nesse sentido, esta quimera parece possuir função similar as outras oncoproteínas de fusão da LPA.

Um importante potencial da proteína STAT5b-RAR α é sua habilidade em interferir na via de sinalização das proteínas STAT. Esta proteína quimérica conserva a porção N-terminal do domínio SH2 da STAT5b, dessa forma poderia competir com a proteína normal pelos receptores de citocinas. No paciente estudado a proteína STAT5b encontrou-se localizada no núcleo, enquanto que nas células medulares utilizadas como controle a STAT5b se localizava no citoplasma (Arnould *et al.*, 1999). A proteína STAT5b-RAR α pode formar heterodímeros com a STAT5b selvagem em células transfectadas¹² e assim inibir a expressão do gene da prolactina estimulado. Contrariamente, a STAT5b-RAR α acentua a expressão da IL-6 mediada por um promotor dependente de STAT3 (Dong e Tweardy, 2000). Os potenciais efeitos pleiotrópicos da STAT5b-RAR α devem desregular a capacidade da STAT5b selvagem ou das outras proteínas STAT de responder as citocinas e dessa forma levam a proliferação celular e/ou controle da sobrevivência alteradas. Este fato poderia explicar a resistência ao ATRA do paciente que desenvolveu essa forma variante da LPA, apesar da fusão STAT5b-RAR α apresentar propriedades muito similares à fusão PML-RAR α . Estes achados podem servir de ponto de partida para mais estudos da via de sinalização STAT nas outras formas da LPA, uma vez que foi demonstrado que as citocinas podem aumentar os efeitos de diferenciação do ATRA (Nakamaki *et al.*, 1994). Sendo assim, semelhantemente a PLZF, a proteína STAT5b representa um fator de transcrição fusionado a RAR α , que sozinho pode possuir função no desenvolvimento hematopoético normal e neoplásico (Zelent *et al.*, 2001).

¹² Transfecção gênica (horizontal ou lateral) é qualquer processo no qual um organismo incorpora material genético de outro organismo sem ser descendente deste último. Contrariamente, a transfecção gênica vertical ocorre quando um organismo recebe material genético de seu antecessor, ou seja, seus pais ou de uma espécie apartir da qual ele evoluiu. A transfecção gênica horizontal artificial é uma ferramenta da engenharia genética (Beckwith e Sihavy, 1992).

6.3 Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – HUOC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1ª andar

Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.

Fone: (81) 2101.1530 – Fone/Fax: (81) 2101.1536

E-mail: cephuoc@yahoo.com.br

Reunião: 25/03/2008

Projeto CEP-HUOC/PROCAPE: 018/2008

Projeto: *Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações por citogenética clássica e molecular, anticorpo monoclonal (PG-M3) e biologia molecular*

Pesquisador Principal: Terezinha de Jesus Marques Salles

Resultado:

- Projeto de pesquisa – APROVADO.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEP/HUOC
Prof. América Gusmão Amorim
Vice-Coordenador

6.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo cromossômico consecutivo multicêntrico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância

Nome do Voluntário: _____

Você, em breve, será submetido a um estudo citogenético. Por isso está sendo convidado a participar de uma pesquisa que envolve análise cromossômica de células de aspirado de medula óssea ou de sangue periférico.

Os estudos citogenéticos são coadjuvantes no diagnóstico morfológico e de um fator de risco de recaída da doença. Além disso, estes estudos são a base fundamental para detectar genes envolvidos na leucemogênese e contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde inclui o diagnóstico citogenético de pacientes com hemopatias malignas para classificar o diagnóstico clínico e o risco de recaída da doença.

Este estudo contribuirá como desenvolvimento clínico, diagnóstico e experimental dos pacientes com leucemia mielóide aguda da infância.

Para você decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Descrever os grupos com alterações citogenéticas dos pacientes pediátricos com LMA, correlacionando-os com os aspectos clínicos e prognósticos.

Detectar a porcentagem de anomalias cromossômicas da LMA na infância. Correlacionar as anomalias cromossômicas presentes no diagnóstico com a evolução da doença. Caracterizar anomalias variantes através de processos moleculares.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo citogenético será coletado 2 amostras do seu aspirado de medula óssea, pelo procedimento de punção de medula óssea ou sangue periférico numa quantidade variante de 5 a 10 mililitros (referente a uma colher de sopa) para serem submetidas a exame de citogenética. A amostra de

aspirado de medula óssea ou sangue periférico será encubado e será cultivada, a partir deste material, uma cultura celular, onde o objetivo é obter metáfases, as quais serão devidamente estudadas, por microscopia óptica, apontando as anomalias cromossômicas envolvidas na LMA da infância.

Para exames envolvidos neste estudo será utilizada uma parte do material (sangue) obtido para realização de exames rotineiros.

RISCOS

O seu tratamento será o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A coleta de aspirado de medula óssea ou sangue periférico para o estudo coincidirá com a coleta de aspirado de medula óssea ou sangue periférico para os exames rotineiros de forma a não ser prevista punção de medula óssea ou de sangue adicional. Essas punções para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses. No entanto, essas coletas de material não oferecem maior risco à sua saúde, uma vez que, são realizadas por profissionais especializados. Dessa forma, não há risco adicional aos existentes para os exames de rotina durante o tratamento padrão ou nenhum risco adicional conhecido.

BENEFÍCIOS

O estudo citogenético será de grande relevância para o seu tratamento, pois permitirá o fornecimento de indicação diferencial de diagnóstico e escolha de tratamento apropriado para o risco da doença e possibilita a cura da doença.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital Oswaldo Cruz e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano recorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação o estudo a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

AUTORIZAÇÃO DE MENOR

Nos casos em que o paciente for menor de idade os pais ou responsáveis também deverão concordar com a participação do menor neste estudo. Sendo estes consultados e devidamente esclarecidos sobre os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra. Terezinha de Jesus Marques Salles nos telefones (81) 3422-0908/9451-7243. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode com uma terceira pessoa imparcial integrante do Comitê de Ética do Hospital Oswaldo Cruz, telefone (81) 2101-1536/1530.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA
(Paciente Maior de 18 anos)

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Recife, _____ de _____ de 200__

Assinatura do Paciente

Nome do Paciente (letra de forma)

Assinatura de testemunha (se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA
(Paciente Menor de 18 anos)

Através deste termo e após os esclarecimentos devidos quanto ao tratamento a ser submetido o (a) menor _____, na condição de seu responsável legal, concordo com o respectivo tratamento, consciente dos riscos, vantagens e possíveis efeitos adversos que possam ser resultantes do mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Desta maneira, apresento meu livre consentimento para que o (a) paciente acima indicado (a) participe do referido tratamento.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Recife, _____ de _____ de 200__

Assinatura do responsável pelo paciente

Nome do responsável pelo paciente (letra de forma)

(Assinatura de testemunha, se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento